



國立臺灣大學生命科學院漁業科學研究所

碩士論文

Institute of Fisheries Science

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

點帶石斑魚 CD9 基因啟動子之活性與特性及添加

poly(I:C) 與感染石斑魚虹彩病毒的表現分析

Activity and Characterization of Orang-spotted Grouper
(*Epinephelus coioides*) CD9 Promoter, and Its Expression
Analysis in Response to Poly(I:C) and GIV Infection

劉千維

Chien-Wei Liu

指導教授：張繼堯 博士

Advisor: Chi-Yao Chang, Ph.D.

中華民國 102 年 7 月

July 2013

謝辭



心懷無限的感激！謝謝老師細心、耐心地指導及百般寬容，也謝謝老師在這些過程中的好脾氣，且不辭辛苦花費下班時間指導，讓千維最終能順利地畢業。

很高興一年級的生活有賓鴻及政霖學長，謝謝賓鴻的幽默總能讓我開心大笑！你的畢業，讓我不捨。也很謝謝政霖學長曾給過的建議及協助，更謝謝你總適時的提點，並給予信心，還好碩一生活有你在。很開心在深夜的實驗室，總有好同學奕森、草菇學長、立雄學長及甥哥學長的陪伴。擁有能夠一起加油打氣、分享快樂、悲傷、焦慮與壓力的同學真的很棒，也因為同學的存在，無形中成為督促自己的力量！謝謝在這一路跌跌撞撞的碩班生活中，有草菇學長的指導，謝謝你的指教，使我在實驗過程裡，慢慢學會了許多技巧與方法，以及獨立操作時應有的態度與認知！也感謝立雄學長無私細心的指導，讓我能夠抓住照顧細胞的訣竅，使它們乖乖聽我的話！更因為有你的笑鬧，讓實驗室生活多了好多歡樂的氣息。謝謝甥哥總在沒有藥品、我找不到東西鬼打牆的許多關鍵時刻伸出援手，及時拯救了我！另外也很謝謝買飯的路上，常有惠茹的陪伴，感謝實驗室有妳這個知己！謝謝朝安學長及秋月學姊平時的照顧，在最後衝刺的日子，提供了許多的協助及生統上的支援，燃眉之急時，尤如雪中送碳，使我備感窩心。感謝怡仁學長及琇婷學姊於實驗上所提供的幫助。特別謝謝好幾個疲憊的深夜，還有草菇學長、奕森同學及立雄學長，一起在深夜說笑，一起看見清晨的曙光，一起吃早餐，沒有你們，一個人的深夜會是多麼孤單，那段日子，確實是個難忘的回憶。千維感謝在實驗室所有曾經幫助過我的人們，我的論文，絕非我個人心血結晶，而是集結眾人的意見與智慧，站在你們的肩膀上，才得以成就，感謝你們的付出。

很感謝在漁科所，還能結識一群好友，能夠一起吃飯，一起討論研究生活的疑難雜症，彼此照料，相互提醒，也特別謝謝政憲，在這些日子幫了不少忙，真的是麻煩你了！

謝謝我親愛的爸爸與媽媽，不論是在經濟上的支持使我得以專注於研究，或是你們無私、源源不絕付出的愛。也很高興我有哥哥們和嫂嫂們，甫出世可愛的侄子姪女，如開心果般地撫慰我時而疲憊的心情。家，始終是遊子最溫暖、感受最深刻的避風港。好感謝我有個美滿的家庭，給我毫無後顧之憂的碩班生活。

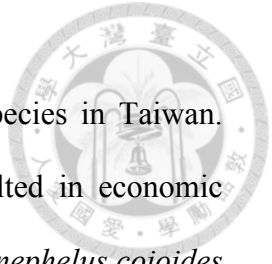
摘要

石斑魚是台灣水產養殖重要魚種，具高經濟價值，然其幼苗成長時期易受石斑魚虹彩病毒 (grouper Iridovirus, GIV) 感染而大量死亡，故本實驗室以易於養成之點帶石斑魚 (*Epinephelus coioides*) 為材料，研究石斑魚與 GIV 之交互作用。2012 年吳與劉於本實驗室對點帶石斑魚施打 poly(I:C)、GIV 及 LPS，發現 poly(I:C) 及 GIV 注射後，CD9 表現模式與其他干擾素 (interferon, IFN) 相關之基因相仿。IFN 在病毒感染後，扮演先天性免疫與後天性免疫間重要的橋樑，影響抗病反應，但 CD9 的角色是個謎，2012 年楊取得點帶石斑魚 CD9 cDNA 全長，並發現主要表現在免疫器官上，故希望取得 CD9 啟動子以了解與 GIV 之關係。

根據本實驗室所獲得之點帶石斑魚 CD9 cDNA 全長，利用染色體步移技術 (Genome Walking)，獲得約 1.2 Kb 及 2.6 Kb 的 CD9 啟動子 (promoter)，經定序並分析其轉錄因子結合位 (transcription factor binding site) 後，預測 CD9 啟動子可能含有 AP-1、ApoD、C/EBP、NF- κ B、TNF- α -Y-BOX、IRF1 和 IRF2 的結合位。透過冷光酵素的測定 (Luciferase Assay)，得知在 GK (grouper kidney) 細胞及 GB (grouper brain) 細胞，1.2 Kb CD9 有一定量表現，2.6 Kb CD9 近乎不表現，且活性皆不受不同濃度 poly(I:C) 的影響。藉由 GK 細胞中 CD9 啟動子的刪除實驗得知，在 1.2 Kb 及 2.6 Kb 間的 CD9 啟動子可能含有抑制調控因子的結合位；1.2 Kb CD9 在相對靠近轉錄起點端的 124 bp 及 400 bp 至 679 bp 之間可能有關鍵影響 CD9 表現之結合位。不同大小的 CD9 啟動子，在 GK 細胞均不受不同濃度 poly(I:C) 的影響，感染 GIV 後，可能受抑制而近乎不表現 CD9。透過 NF- κ B 之次單元 *c-rel* 於 GK 細胞的共同轉染，可促進 CD9 啟動子的調控。以 RT-PCR 測定之內生性 CD9 在 GK 細胞不同濃度 poly(I:C) 下不同時間點的表現均無差異。自點帶石斑魚活體的頭腎 (Head Kidney, HK) 及脾臟 (Spleen) 組織純化出的白血球細胞，添加 poly(I:C) 後，以 RT-PCR 測定，發現 CD9 在 HK 及 Spleen 白血球細胞不同的時間點均沒有差異，然而頭腎及脾臟白血球細胞中的 IFN α 與 Mx 都會受到 poly(I:C) 的刺激而提高表現量，並在達到高峰後降低表現。

綜合本研究結果，認為 CD9 基因的調控可能與 NF- κ B 有關，且可能受到 GIV 感染而受到抑制，然而 CD9 的表現是否還可能與其他因子有關及在 GIV 感染時扮演什麼樣的角色有待進一步證實。

Abstract



High economic benefits make groupers important aquacultural species in Taiwan. However, the disease caused by grouper iridovirus (GIV) has resulted in economic losses due to high mortality in grouper culture. Therefore we take *Epinephelus coioides* which easily raised as our model to study the interactions between groupers and GIV. In 2012, Liu and Wu injected poly(I:C), GIV and LPS into orange-spotted groupers and discovered the expression pattern of CD9 resembling to those genes associated with interferon (IFN). IFN influencing antiviral effects are important bridges between innate immunity and adaptive immunity, but the role of CD9 remains unknown. We gained the total length of CD9 cDNA from orange-spotted grouper (Yang, 2012), finding that CD9 mainly expressed in immune organs. Thus, we hope to get CD9 promoter for further analysis to realize its relationship to GIV.

According to the total length of CD9 cDNA gained, we obtained 1.2 Kb and 2.6 Kb CD9 promoters from genome walking. Through analysis of sequence and transcription factor binding sites, we predicted that CD9 promoters might contain binding sites of AP-1, ApoD, C/EBP, NF- κ B, TNF- α -Y-BOX, IRF1 and IRF2. By luciferase assay, we found that 1.2 Kb CD9 promoter but not 2.6 Kb CD9 promoter regularly expressed in GK cells and GB cells, and their activities weren't affected by different concentration of poly(I:C). In deletion analysis of CD9 promoter in GK cells, 2.6 Kb CD9 promoter might have negative regulatory factor binding sites. Some binding sites located in 124 bp near the side close to transcription initiation point and the part between 400 bp and 679 bp of CD9 promoter might play a key role to affect expression. CD9 promoters with different lengths were also not affected by various concentration of poly(I:C), but the infection of GIV inhibit CD9 promoters, causing extremely low activity. Co-transfection with subunit of NF- κ B, *c-rel* in GK cells up-regulated CD9 promoter.

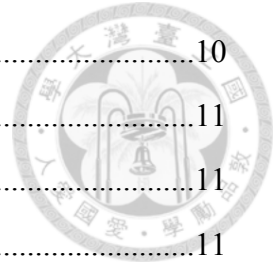
Measuring endogenous CD9 expressions in response to poly(I:C) treatment in GK cells by RT-PCR showed no differences. Although the percoll purified white blood cells from head kidney and spleen of orange-spotted grouper showed no CD9 transcriptional difference after poly(I:C) treatment, IFN α and Mx expression showed significant up-regulation.

In summary, the CD9 transcriptional regulation might associate with NF- κ B, and might be inhibited by the infection of GIV. However, the transcription factors involving in CD9 promoter regulation during GIV infection remain further study.

目 錄



謝辭.....	I
摘要.....	II
Abstract.....	III
目錄.....	V
圖目錄.....	VIII
表目錄.....	IX
附錄.....	X
第一章、前言.....	1
1.1 石斑魚簡介與台灣養殖概況.....	1
1.2 虹彩病毒(Iridovirus).....	3
1.2.1 虹彩病毒分類.....	3
1.2.2 石斑魚虹彩病毒與魚類的關係.....	3
1.3 四穿膜蛋白家族(tetraspanin superfamily).....	4
1.3.1 四穿膜蛋白家族在生物體中扮演的角色.....	4
1.3.2 四穿膜蛋白家族的結構特徵.....	5
1.3.3 四穿膜蛋白網絡結構.....	5
1.3.4 四穿膜蛋白與病毒之間的交互關係.....	5
1.4 CD9 (Cluster of Differentiation 9).....	6
1.4.1 CD9.....	6
1.4.2 CD9 與病毒之間的交互關係.....	6
1.5 研究動機.....	7
第二章、材料與方法.....	8
實驗材料與藥品試劑.....	8
實驗方法.....	10
2.1 細胞培養 (cell culture).....	10
2.1.1 細胞株及培養條件.....	10
2.1.2 細胞繼代 (passage) 培養.....	10
2.2 實驗魚隻.....	10



2.3 Genomic DNA 純化.....	10
2.4 染色體步移 (genome walking)	11
2.5 冷光酵素報導表現載體 (luciferase reporter vector)之構築.....	11
2.6 啟動子序列刪除分析.....	11
2.7 轉形作用.....	12
2.8 轉染作用.....	12
2.9 冷光酵素測定 (luciferase assay).....	12
2.10 石斑魚虹彩病毒效價(titer)測定.....	13
2.11 多層次 Percoll 濃度差分離.....	13
2.12 RNA 萃取.....	13
2.13 RT-PCR.....	14
第三章、結果.....	15
3.1 點帶石斑魚 CD9 啟動子選殖與轉錄因子結合位分析.....	15
3.2 點帶石斑魚 CD9 啟動子的活性分析.....	15
3.2.1 Poly(I:C) 對點帶石斑魚 CD9 啟動子的活性分析.....	15
3.2.2 點帶石斑魚 CD9 啟動子刪除分析.....	16
3.2.2.1 點帶石斑魚不同長度之 CD9 啟動子分析.....	16
3.2.2.2 不同濃度 poly(I:C) 對 GK 細胞中點帶石斑魚不同長度 CD9 啟動子的影響.....	16
3.2.2.3 GIV 的感染對在 GK 細胞中不同長度的點帶石斑魚 D9 啟 動子活性影響.....	17
3.2.2.4 共同轉染石斑魚 <i>c-rel</i> 基因對點帶石斑魚 CD9 啟動子活性 的影響.....	17
3.3 RT-PCR.....	18
3.3.1 Poly(I:C) 處理不同時間後之點帶石斑魚內生性 CD9 於 GK 細胞 的表現分析.....	18
3.3.2 Poly(I:C) 處理點帶石斑魚 HK 和 Spleen 白血球細胞對內生性 CD9、IFN 及 Mx 基因在不同時間點的表現影響.....	18
第四章、討論.....	20



圖目錄



圖一、以染色體步移 (genome walking) 技術取得點帶石斑魚不同長度之 CD9 啟動子.....	32
圖二、CD9 啟動子 1.2 Kb 及 2.6 Kb 序列.....	33
圖三、1.2 Kb 及 2.6 Kb 的 CD9 啟動子報導表現載體之活性表現及不同濃度 poly(I:C) 對 CD9 啟動子的影響.....	35
圖四、在 GK 細胞中 2.6 Kb 及 1.2 Kb CD9 啟動子的刪除分析(deletion).....	36
圖五、在 GK 細胞中不同濃度 poly(I:C) 對不同長度 CD9 啟動子活性影響.....	37
圖六、GIV 的感染 (MOI=10) 對不同長度點帶石斑魚 CD9 啟動子在 GK 細胞中表現影響.....	38
圖七、共同轉染石斑魚 <i>c-rel</i> 基因對點帶石斑魚 CD9 啟動子的活化分析.....	39
圖八、Poly (I:C)對不同時間點 CD9 在 GK 的表現情形.....	40
圖九、Poly (I:C) 對點帶石斑魚 CD9、IFN 和 Mx 基因在 HK 及 Spleen 細胞表現的影響.....	41

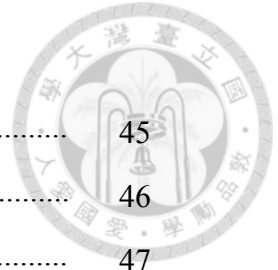
表目錄



表一、實驗使用之引子序列.....	43
-------------------	----

附錄

附錄一、實驗所使用之質體 –pGL3.....	45
附錄二、實驗所使用之質體 –pRL-CMV.....	46
附錄三、實驗所使用之質體 –pcDNA3CF.....	47
附錄四、四穿膜蛋白結構(一).....	48
附錄五、四穿膜蛋白結構(二).....	49
附錄六、四穿膜蛋白網.....	50





第一章、前言

1.1 石斑魚簡介與台灣養殖概況

石斑魚中文俗稱「鱸魚」或「過魚」，英文俗稱為 grouper、Coral Trout、Rockcod，隸屬於鮨科 (*Serranidae*)、石斑亞科 (*Epinephelinae*)、石斑魚屬 (*Epinephelus*)，身體肥厚，口部大，善於瞬間衝刺，較不適合長期迅速游泳，喜歡棲息於沿岸的珊瑚礁、砂礫及岩礁海域，不成群，為夜行性的兇猛肉食底棲性魚類。由於石斑魚顎部齒細小，主要利用咽喉齒將食物碾碎，故通常在躲藏於洞穴中，等待獵物靠近時，一口吞嚥。主要以魚、蝦、蟹、頭足類為食，成長過程會發生性轉變，先雌後雄。春夏季活動於水深 10 ~ 30 米處，但盛夏時也可在 1 ~ 2 米處發現，秋冬氣溫較低則下降至水深 40 ~ 80 米的地方。石斑魚為廣鹽、廣溫性的魚種，在鹽度 11 ~ 41 ‰皆可生存，適合生存的溫度範圍為 15 ~ 35°C，全世界共有 400 多種，廣泛分佈於印度洋、太平洋暖海沿岸區，西起非洲東岸，東至薩摩亞及費尼克斯群島，北自日本南部，南迄澳洲等都可發現石斑魚的蹤跡，在台灣則有 110 種的記錄。而目前養殖的石斑魚種以瑪拉巴石斑(俗稱黑點、朱鱸、青斑)、點帶石斑 (俗稱紅點、朱鱸、青斑)、鞍帶石斑 (龍膽石斑)、棕點石斑魚 (虎斑)、老鼠斑、豹鱸 (俗稱東星斑、七星斑)、藍身大石斑 (金錢斑)、玳瑁石斑等為主。

養殖魚類的幼苗成長一直是非常重要的環節，孵化的魚稱仔魚 (larva)，於石斑魚又俗稱魚花，經過二到三天利用完卵黃的養份後，開始開口攝食，慢慢地，背、腹鰭的第二硬棘快速增長，即「發翅」，又俗稱「發翅仔」，於水中外觀猶如三腳架般，約第十五天起開始「收翅」，也就是長棘縮短；約在第二十四至第三十天為紅頭期，進入變態階段的完整魚苗，俗稱「白身」(fry)；等到斑點及花紋出現，則進入稚魚期 (juvenile) 以及後續的成魚期 (adult)。成魚期的養殖一般約 8~12 個月即可達到上市體型。

石斑魚養殖最大的特色是產業分工細膩，大略依石斑魚苗發育的階段分工，有專門照顧種魚，負責採卵的業者；專門孵化及培育仔稚魚的業者；專門培育仔稚魚苗至供應養殖場所需魚苗的業者，以及購買魚苗放養至成魚出售的養殖場。簡而言之，可分為種魚養殖(魚卵孵化)場、幼稚魚苗 (白身、寸苗)養殖 (受精卵 ~ 8 分至一吋階段)、大魚苗 (中間育成) 養殖場及成魚養殖場等。

一般來說，種魚養殖場通常進行的工作是將石斑魚培育至性成熟後，促使其排卵、授精，最後將卵售予種苗培育場。石斑魚屬於先雌後雄的雌雄同體(Protogynous hermaphrodite)，孵化後三年的母魚可達性成熟，在第七、八年時才性轉變為雄魚，雄性種魚需耗費多年時間養殖，野外成熟雄魚體型偏大且不易捕獲，因此石斑種魚價值昂貴，不利於人工繁殖工作，且目前育苗存活率低，魚苗價格高。

一般石斑魚多在春夏繁殖，有些延至初秋，然因技術不斷進步，上述之點帶石斑魚即可全年繁殖。利用人為方法刺激雄魚達性成熟後，一隻雄魚配對數隻雌魚，讓他們在良好的環境下，即可追尾並產下精子、卵子。

以點帶石斑為例：卵黃被吸收後的石斑魚花會開口攝食，可餵以乾淨不帶有病原的牡蠣受精卵、微藻及極小型輪蟲，在約第 5 天時，改投餵微藻及小型輪蟲，直到 20 天起，可將輪蟲改為豐年蝦及橈足類，約在 40 天時，可以豐年蝦或橈足類等會動的餌料生物混以飼料，誘導小石斑吃飼料(又稱過料)，約在 45~50 天時，石斑魚開始有如成魚般的體型及體色，即可作為石斑魚種苗。若為傳統養殖場，則需「作水」另外，在養殖過程需特別注意的是，需每隔一段時間篩選魚苗的大小，此乃因石斑生性兇殘，飢餓時會互相殘食，且因體型差異不夠足大，吃下另一隻石斑者，通常無法真正嚥下牠的同伴，且吞食的過程，同伴的硬鱗會將腸胃劃破，往往是兩敗俱傷，故養殖時必需定時將體型差異太大的個體予以分開，以免造成無謂的損失。

種苗培育階段完成後，石斑魚幼苗已漸漸強壯，開始對外界環境的刺激具有較強的抵抗力，因此飼養上也相對簡單，一般約在每年農曆 3~4 月放養，以飼料、下雜魚和鰻粉交互投餵，並維持良好的水質，約經過 8~12 個月可達一般上市體型六百克。

石斑魚是目前公認食用魚中的高貴魚類，其肉質細膩鮮美、富含大量膠質且營養豐富，在華人市場中廣受消費者喜好而需求甚為殷切。台灣自民國 64 年開始在澎湖地區試養石斑魚成功後，業者便紛紛投入石斑魚養殖的行列。石斑魚具有著生長快速、適應力強的優勢，業者以豐富的經驗及台灣人獨特的韌性建立起石斑魚業的一片天，然而近年來，大陸市場崛起，台灣養殖業者紛紛出走，部份於大陸紮根，大陸養殖業者亦隨著政治經濟的發展逐漸起步，使大陸、香港市場

的訂單不再獨厚台灣，因此台灣石斑魚產量出現供過於求而致魚價下跌的情形，然而即使如此，石斑魚仍保持其價值及穩定的定位，依然為台灣重要養殖產業的一環。石斑魚目前主要養殖的國家，除了台灣、香港、大陸外，新加坡、馬來西亞及印尼等地區也順應這股養殖熱潮，積極從事石斑魚之養殖(冉，2007；張，2009)。

1.2 虹彩病毒(Iridovirus)

1.2.1 虹彩病毒分類

依照國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Virus；ICTV) 2006 年報告，將虹彩病毒科 (*Iridoviridae*) 歸類為雙股去氧核糖核酸病毒 (Double-strand DNA virus)，病毒顆粒直徑大小為 120 ~ 200 nm，為正二十面體病毒。虹彩病毒科 (*Iridoviridae*) 的命名取自於希臘彩虹女神 Iris 的名字，此因重度感染的昆蟲幼蟲與離心後的病毒塊呈現藍、綠色的虹光而稱之。包括無脊椎動物及非哺乳類的脊椎動物皆為虹彩病毒科的主要宿主 (De Kinkelin and Bearzotti, 1981)。

目前的分類乃在虹彩病毒科區分為五個屬：虹彩病毒屬(*Iridovirus*，病毒直徑約 185 nm，主要感染於昆蟲，代表性病毒為 Chilo iridescent virus (CIV, 又稱 IIV6))，綠虹彩病毒屬(*Chloriridovirus*，病毒直徑約為 180 nm，主要感染於蚊子，代表性病毒為 Mosquito iridescent virus (IIV3, Invertebrate iridescent 3))，蛙虹彩病毒屬(*Ranavirus*，病毒直徑約 120 ~ 350 nm，主要感染在蛙類和魚類，代表性病毒為 Frog virus 3 (FV3))，淋巴囊腫病毒屬(*Lymphocystivirus*，病毒大小約為 120 ~ 350 nm，主要感染在魚類，代表性病毒為 Lymphocystis disease virus 1 (LCDV-1))，以及巨細胞病毒屬(*Megalocytivirus*，其病毒大小約為 140 ~ 200 nm，主要感染魚類，代表性病毒為 ISKNV (infectious spleen and kidney necrosis virus)。

1.2.2 石斑魚虹彩病毒與魚類的關係

感染虹彩病毒之魚體初期體色發黑，偶然可發現眼球混濁的情形，亦常在鰓部發現充、出血現象。爾後鰓絲漸呈淡紅或蒼白，脾臟、頭腎明顯腫大。發病初期，只有數尾魚隻體色發黑，但攝餌正常，有時一日會死數尾。隨後死亡率漸增，

整個疫情約持續 1-2 個月。幼魚(3.5-9.5 公分)感染率長達 100%，而致死率則 60% 以上；體長超過 25 公分之成魚，其死亡率在 5-30%。組織病理變化之特徵，可在脾、腎、心、肝和鰓部組織中，發現大小不一之肥大細胞，這些細胞的核偏於一邊，細胞質或成顆粒狀或成均質狀，且在脾臟和腎臟的特別多(劉，2003)。

台灣的石斑魚養殖在病害問題重挫草蝦養殖業的 70 年代興起，隨著養殖面積的激增和單位面積放養量的提高，不僅造成環境的惡化，以致養殖魚感染疾病的機會增加，同時因為魚苗需求量大，業者只好由泰國和菲律賓等東南亞國家進口未經隔離檢疫的魚苗，如此一來，導入許多新的病原，其中以病毒的影響最甚，虹彩病毒的疫情爆發於 90 年代，至今已持續十幾年在台灣造成重大經濟損失。

1.3 四穿膜蛋白家族(tetraspanin superfamily)

1.3.1 四穿膜蛋白家族在生物體中扮演的角色

四穿膜蛋白 (tetraspanins) 是一群在物種間具有高度保留性的穿膜蛋白，最早在 6 億年前即出現在地球上，且廣泛分佈在不同的物種，如植物和真菌，也分佈在低等動物血吸蟲、海綿、線蟲，或高等的脊椎動物如魚類、爬蟲類及哺乳類等，人類身上亦可發現其蹤影。現今已有 33 種四穿膜蛋白被發現，部份的四穿膜蛋白可呈現某些特定功能或具有有限的表現能力，而多數四穿膜蛋白廣泛分佈的細胞表面或內膜通常表現多種四穿膜蛋白。

四穿膜蛋白在基礎的細胞功能上扮演著重要角色，如細胞的貼附、移動、細胞與細胞的融合及膜上的運輸作用；亦參與許多的生物過程，包含卵子的受精、寄生蟲感染的耐受性、癌細胞的轉移及免疫系統中細胞與細胞間的交互作用等，具豐富的功能性及多樣的表現模式。具有這樣的特性乃因四穿膜蛋白易與其他相同或相異的 tetraspanins 或非四穿膜蛋白如嵌入素 (integrins) 等共同形成富含 tetraspanins 的分子網絡，稱為四穿膜蛋白網。而因為不同蛋白的協同作用使這樣的網絡相較於單一的蛋白出現了全新、複合的功能性，這樣的特性更使單一四穿膜蛋白的功能難以定義。四穿膜蛋白亦如鷹架般，調控與其交互作用之蛋白的局路聚集並放大它們的活性，故單一 tetraspanin 的剔除可能造成極負面的效應 (Monk and Patridge, 2012)。



1.3.2 四穿膜蛋白家族的結構特徵

四穿膜蛋白較於一般穿膜蛋白小，屬於 type III 膜類糖蛋白，嵌於細胞膜上具備四個穿膜區，向細胞內部突出 N 端及 C 端，在穿膜的折疊中，各向細胞外延伸出兩個環區 (extracellular loop, EC)，一小 (EC1) 一大 (EC2) (Peter, 2012)。四個穿膜區內皆帶有保留的極性區域，且在近細胞內膜處有多個半胱氨酸 (cysteine) 為 palmitoylation (棕櫚酸脂化) site，是重要的特徵。另外，所有的四穿膜蛋白都含有保留性的 Cys-Cys-Gly motif 和 2 到 6 個 cysteine 與其配對，且大多數這樣的區域可能藉由雙硫鍵形成一次單元環，該次單元環在 cysteine 的組成變化即為不同四穿膜蛋白的差異所在，亦帶來物種間多樣化的面貌 (Seigneuret et al., 2001)，同時也是抗四穿膜蛋白抗體辨識的主要區域。而在大環區中相對於次單位環的其它區域，則皆具有著高度結構保留的特性 (Stipp, Kolesnikova, and Hemler, 2003)。

1.3.3 四穿膜蛋白網絡結構

四穿膜蛋白網絡作用力的強弱取決於四穿膜蛋白間階段性的交互作用 (Stipp, Kolesnikova, and Hemler, 2003)。共可區分為三個級別，其中，一級四穿膜蛋白作用力主要來自膜外大環區，而次單元環佔決定性影響力。二級四穿膜蛋白作用力則跟蛋白上的穿膜區及細胞內的胺基酸長鏈有關，此作用力屬於間接與主要四穿膜蛋白結合，進而促使結構更為穩固。三級四穿膜蛋白作用力則非常不穩定，主要由多種四穿膜蛋白以及相關的關連蛋白彼此交互作用下所形成。四穿膜蛋白網絡在結構上看似穩固，但由於三級四穿膜蛋白微弱的作用力，使得四穿膜蛋白網絡並非靜止不動的，網絡形成的因素主要還是取決於刺激來源 (Peñas et al., 2000)。

1.3.4 四穿膜蛋白與病毒之間的交互關係

四穿膜蛋白已被証實在疾病的感染 (如白喉、瘧疾及多種病毒感染) 中扮演重要的角色 (Martin et al., 2005)，特定的四穿膜蛋白家族成員會選擇性的與特定的病毒作用，並且在不同的感染時期 (從細胞接觸到病毒到病毒顆粒的釋出) 有著影響性，也因此四穿膜蛋白與病毒之間的交互關係顯得格外的複雜。

目前與病毒相關聯，研究最透徹的四穿膜蛋白是 CD81 參與 HCV 的 (Hepatitis C Virus) 感染。HCV 病毒的外套膜糖蛋白 E2 促使病毒與細胞結合，而

CD81 則參與 E2 的結合促進 HCV 的感染(de Knecht and van den Berg, 2001)。另外使用 CD81-LEL 單株抗體則可與受 Epstein-Barr virus 感染的 B 淋巴球重組的 E2 蛋白結合，進而抑制病毒的擴散(Pileri et al., 1998)。使用 CD82 antibody 可抑制 HTLV-1 造成的細胞病變與核融合的情況(Fukudome et al., 1992)。CD63 則與 HIV-1 的病毒顆粒從受感染細胞的釋出有關(Gluschankof et al., 1997)，同時使用 anti-CD63 抗體則可有效抑制 HIV-1 的感染(von Lindern et al., 2003)。

1.4 CD9 (Cluster of Differentiation 9)

1.4.1 CD9

CD9 是四穿膜蛋白的家族成員，具備有四個穿膜區，其中大環區 (EC2) 含有 Ser-Phe-Gln 的胺基酸，其為配子結合所需 (Zhu et al, 2002)。CD9 廣泛分佈在許多細胞的表面上，如造血細胞、內皮細胞、表皮細胞及惡性腫瘤細胞等(Boucheix and Rubinstein, 2001; Hemler, 2003)。並與其他的細胞表面蛋白 (如 CD81 和 CD151) 及 integrins、EWI 蛋白 (EWI-2 及 EWI-F) 等組成四穿膜蛋白網 (Hemler, 2005)，參與了許多的細胞作用，如：細胞的分化、貼附、訊號的傳遞等，目前較為人知即為在小鼠實驗中，CD9 的 knockout 導致精子與卵子無法成功融合，而造成雌鼠不孕 (Kaji et al., 2000; Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000)。CD9 也在抑制癌症細胞的轉移及代謝扮演重要的角色，可抑制多種癌細胞的功能。在黑色素瘤、乳癌、肺癌、胰臟癌及結腸癌細胞大量表現 CD9，可能抑制上述細胞的轉移及代謝。

1.4.2 CD9 與病毒之間的關係

除了在精卵結合、癌症抑制中扮演重要的角色，CD9 也與病毒有關，有報告指出 HIV 可能在樹突細胞表面由 CD9、CD81、CD82 所構成且富含 AP-3 的結構上進行複製 (Garcia, Nikolic and Piguet, 2008)，亦可能透過含有 CD9/CD63 的 exosome 相似顆粒自細胞釋出 (Wiley and Gummuluru, 2006)，而在 HeLa 細胞上可能由 HIV 結構蛋白 Gag 所引起的特定 budding site 可找到 CD9、CD63、CD81 和 CD82 (Nydegger et al., 2006)，且活細胞四穿膜蛋白的分析也發現 Gag 確實會引起富含 CD9 的微域聚集(Krementsov et al., 2010)。另外，在製造病毒的細胞和接受病毒細胞間形成的突觸亦可看見 CD9、CD81、CD63 與 Gag 環的縱影

(Krementsov et al., 2009, 2010; Rudnicka et al., 2009)，更有研究在 HIV-1 病毒顆粒上發現 CD9、CD81、CD82、CD231 (Meerlo et al., 1993)，而由蛋白分析的結果得知，在流感病毒所引發宿主表現的 36 個蛋白中，CD9 和 CD81 被嵌入病毒的套膜中(Shaw et al., 2008)。此外，CD9 抗體 K41 使細胞間黏著處的 CD9 和其他四穿膜蛋白重新分佈而干擾了 HIV 病毒顆粒自細胞釋放(Khurana et al., 2007)，也在進入細胞的後期抑制了貓免疫缺陷病毒 (feline immunodeficiency, FIV) 的感染(Willett et al., 1994, 1995, 1997)，並阻斷了 FIV 的病毒顆粒釋放(de Parseval et al., 1997)；在犬瘟熱病毒(canine distemper virus, CDV)，K41 則可抑制於多種細胞中的感染(Löffler et al., 1997)，並可抑制感染細胞間的融合(Schmid et al., 2000)。在細胞膜醣肝素含量低時，CD9 可促進第二型腺結合病毒 (adeno-associated virus-2, AAV-2) 的感染(Kurzeder et al., 2007)。上述研究皆顯示 CD9 參與病毒的感染，然而相關研究多以哺乳類為研究對象，在魚類上所扮演的角色目前仍不得而知，故本研究以此為重點進一步探討之。

1.5 研究動機

近年來全球暖化加劇，潛在糧食危機四伏，水產品被視為取代蛋白質來源的絕佳解決方案，也在陸地資源快被消耗殆盡的現今，提供新的希望。石斑魚為亞洲重要經濟魚種，為台灣帶來可觀的收益，而幼苗的孵化與培育是影響收益的關鍵技術與時期，然而 GIV 的感染為幼苗的發育帶來極大的威脅，其致病機制至今仍未明瞭，故本實驗室致力研究之。2005 年，本實驗室完全解構出 GIV 基因體之序列與分析工作，並在 2011 年注射 poly(I:C)、GIV 病毒液至點帶石斑魚體內，經由 qRT-PCR 檢視 1 天、3 天、5 天後的表現，發現一系列與 IFN 相關的基因如 ISG15、DHX58、viperin 等，受到促進調控，其中 CD9 與這些基因有相似的表現模式，於 poly(I:C) 注射後第 1 天有很高表現量的提升，GIV 注射後，則隨時間的拉長增加其表現，因此 CD9 與 IFN 的關聯引發我們的好奇。另有許多研究指出四穿膜蛋白可能在被病毒感染的過程中被"劫持"，作為病毒複製、釋放的媒介，因此也不排除 CD9 在感染 GIV 的過程中協助病毒增殖的可能性。然而四穿膜蛋白功能的多元性令單一種 tetraspanin 難以被定位，因此透過 CD9 啟動子了解 CD9 可能在石斑魚感染 GIV 的過程中扮演著什麼樣的角色，是我們致力想得到的答案。

第二章、材料與方法

實驗材料與藥品試劑

- (1) Grouper Kidney (GK) cell
- (2) Grouper Brain (GB) cell
- (3) Head Kidney (HK) cell
- (4) Spleen (S) cell
- (5) *E. coli* HIT-DH5 α strain (RBC bioscience)
- (6) *E. coli* XL1-Blue MRF' strain (Stratagene)
- (7) *E. coli* TOP10F' strain (Invitrogen)
- (8) T&A cloning vector (RBC bioscience)
- (9) pGL3 basic (Promega)
- (10) pRL-CMV (Promega)
- (11) pcDNA3CF (Yao and Yang, 2003)
- (12) GenomeWalker Universal Kit (Clontech)
- (13) Presto™ mini Plasmid Mini Kit (Geneaid)
- (14) plasmid Midi kit (25) (QIAGEN)
- (15) Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega)
- (16) HiScript I Reverse Transcriptase (BIONOVAS)
- (17) OligodT₍₂₀₎ primer (Invitrogen)
- (18) EasyPure PCR/Gel Extraction Kit (Biomax)
- (19) Econo Taq 2X Master Mix (Lucigen)
- (20) PCR Pfu Master Mix II (GeneMark)
- (21) *Xho*I, *Kpn*I (NEB)
- (22) 50X TAE Buffer (BIOMAN)
- (23) T4 DNA ligase (Roche)
- (24) Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)
- (25) Seakem® LE Agarose (LONZA)
- (26) Agar, Bacteriological (AMRESCO)
- (27) SDS (Bio-Rad)
- (28) Ethidium bromide (EtBr, Merck) (stock 10 mg/ml)
- (29) SyBR safe
- (30) TRIzol® Reagent (Life Technology)
- (31) Phenol, saturated pH 6.6/7.9 (AMRESCO)





- (32) Chloroform (MERCK)
- (33) Ethanol (MERCK)
- (34) 2-propanol (MERCK)
- (35) LB-Broth base (Invitrogen)
- (36) 100 µg/ml Ampicillin sodium (MDBio, Inc)
- (37) Polyethyleneglycol 4000 (MERCK)
- (38) PBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline)
- (39) FBS (Fetal Bovine Serum) (GIBCO)
- (40) Leibovitz's L-15 medium (GIBCO)
- (41) Penicillin Streptomycin (GIBCO)
- (42) L-Glutamine 200mM (GIBCO)
- (43) Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (AMRESCO)
- (44) 0.5% Trypsin-EDTA (10X) (GIBCO)
- (45) 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)
- (46) Sodium Chloride (BioShop)
- (47) Diethyl pyrocarbonate (SIGMA)
- (48) Tris-HCl (MERCK)
- (49) Percoll (Sigma)
- (50) Cell Strainer 100 µm (BD Falcon)
- (51) DNA extraction buffer

10X DNA extraction buffer	
Tris-HCl (pH 8.0)	0.1 M
EDTA	0.01 M
NaCl	1 M
autoclave	
1X DNA extraction buffer	
10X DNA extraction buffer	100 µl
10% SDS	20 µl
10 mg/ml protease K	40 µl
dd H ₂ O	840 µl
1000 µl	



實驗方法

2.1 細胞培養 (cell culture)

2.1.1 細胞株及培養條件

石斑魚腎臟細胞株 (grouper kidney, GK) 及腦細胞株 (grouper brain, GB)，以 10% FBS-L15 細胞培養液培養，培養液包含 10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)，100 units/ml penicillin，100 μ g/ml streptomycin 及 2 mM L-glutamine 的 Leibovitz's L-15 medium (GIBCO)，在不需二氧化碳的 28 °C 培養箱進行細胞培養。

2.1.2 細胞繼代 (passage) 培養

細胞長至八、九分滿時，吸除培養液，加入 1X PBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline) (GIBCO) 清洗後，添加適量的 0.5% Trypsin-EDTA 進行酵素作用約 5 ~ 7 分鐘後，於顯微鏡下觀察，若細胞完全脫落，即加入 10% FBS 培養液中和 trypsin 的作用，反覆沖散細胞直至成為單一顆粒，留下適量細胞，再添加新鮮 10% FBS 培養液均勻打散後，便可放置於 28 °C 培養箱，待約 3 ~ 4 天後繼代。

2.2 實驗魚隻

取來自於南部養殖場所購買的寸苗點帶石斑魚白身苗，飼養於 350 L FRP 桶水溫 25 °C，30 ppt 之循環海水，每天光照 12 小時並打氣，每日餵食 1% 體重飼料一次，養成至約 20 公分大小。

2.3 Genomic DNA 純化

剪下大小約 1 cm² 的石斑魚鰭組織，於含有 1X PBS 的培養皿中清洗後，置於 1.5 ml eppendorf 中，加入 500 μ l 1X DNA extraction buffer (見實驗材料與藥品試劑)，並利用解剖剪刀將組織剪為碎片後，55 °C 作用 1 小時，其中每 10 分鐘反覆翻轉 eppendorf 使其均勻作用。待 1 小時後，加入等量 (500 μ l) pH 8.0 phenol，緩慢上下混勻至乳糜狀，離心 3,000 rpm，10 分鐘。此步驟後使用之 tip 皆應剪去尖端，剪去尖端後，取上清液，重覆 phenol 的萃取步驟，接著取上層液加入等體積 chloroform，緩慢上下混勻至乳糜狀，離心 3,000 rpm，10 分鐘。取上層液重覆 chloroform 之萃取步驟。取上層液加入兩倍體積 (1 ml) 之 100 % ethanol，再以

tip 撈取如黏液般的 genomic DNA，加入兩倍體積 70 % ethanol 潤洗，離心 3,000 rpm，5 分鐘後，謹慎倒掉上清液，風乾約 5 分鐘後，加入適量 dd H₂O 回溶即完成 DNA 純化。



2.4 染色體步移 (genome walking)

根據本實驗室所取得之 CD9 cDNA 全長，設計專一性引子 CD9-pro-sp2R 及 CD9-pro-sp1 (見表一)。取上述純化後之 genomic DNA，以 Clontech GenomeWalker Universal Kit 所附之酵素 *Dra* I、*Eco*R V、*Pvu* II、*Stu* I 37 °C 作用 overnight 將 DNA 切割成片斷後，利用上述之 phenol-chloroform 方法進行再一次純化，將純化後產物加入 kit 所附之 GenomeWalker Adaptor 以 16 °C 進行 ligation overnight。

利用 kit 所附之 Adaptor Primer 1 (AP1) 和 CD9-pro-sp2R 作第一次 PCR，94 °C 解開雙股結構 25 秒，72 °C 作用 3 分鐘，如此 7 個循環以提高專一性，接著 94 °C 作用 25 秒，67 °C 作用 3 分鐘，32 個循環以放大量，最後 67 °C 延長 7 分鐘。將第一次 PCR 產物以 Adaptor Primer 2 (AP2) 和 CD9-pro-sp1 作第二次 PCR，首先 95 °C，5 分鐘完全解開 DNA 雙股結構，接著進入循環，95 °C 30 秒，53 °C 引子黏合 30 秒，72 °C 延長 3 分鐘共 35 個循環，最後 72 °C 延長 7 分鐘。得到的產物進行 TA cloning 後，做定序分析。定序後，序列利用 TFSearch、TESS、Softberry 之 NSITE 作轉錄因子結合位的分析。

2.5 冷光酵素報導表現載體 (luciferase reporter vector) 之構築

利用取得之啟動子序列，設計帶限制酶切位之專一性引子 (表一)，以 PCR 增殖 CD9 啟動子，經 PCR clean-up，並經相同限制酵素切割後，與報導表現載體 pGL3 進行 ligation，透過轉形作用於大腸桿菌中大量複製，再以 kit 純化出載體即可。

2.6 啟動子序列刪除分析

依獲得之 1.2 Kb 及 2.6 Kb CD9 之序列，設計專一性引子，以 PCR 方法增幅放大所要的 CD9 啟動子片段，再接入 pGL3 載體以建構、選殖出含不同大小 CD9

啟動子之報導表現載體。各依實驗設計將不同的報導表現載體轉染於細胞中，於適當時間進行冷光酵素的測定。



2.7 轉形作用

將選用的勝任細胞置於冰上退冰，加入 0.1 μg 的 DNA 載體，輕彈管壁均勻 spin down 後，插冰上靜置 30 分鐘，隨後於 42 $^{\circ}\text{C}$ 加熱板 2 分鐘，進行熱衝擊 (heat shock)，再置於冰上 2 分鐘，加入 0.5 ml 無添加抗生素之 LB 液態培養基，37 $^{\circ}\text{C}$ 震盪培養 30 分鐘，再將經培養後的菌液離心 (3,000 rpm，5 分鐘) 濃縮，倒去大部分上清液後，將剩餘菌液混均並塗於添加抗生素之 LB 固態培養基上。經由 37 $^{\circ}\text{C}$ 培養箱隔夜培養後，即可挑選單一菌落進行小量菌液培養並依實驗設計需求進行後續實驗。

2.8 轉染作用

取欲轉染之載體及 Lipofectamine 2000 依比例分別與不含血清之 L15 細胞培養液混合，靜置 5 分鐘後，將兩者依比例均勻混合 (依 Invitrogen LipofectamineTM 2000 實驗手則，視 plate 大小選擇適當比例)，靜置室溫 20 分鐘。等待時，取已培養至七、八分滿欲轉染之細胞，去除老舊細胞培養液，並置換含血清、L-glutamine、不含抗生素的培養液。待 20 分鐘結束，均勻地將混合液加入培養盤後，置於培養箱中依實驗設計時間培養。

2.9 冷光酵素測定 (luciferase assay)

本實驗採用 Promega Dual-Luciferase® Reporter Assay System，首先將 1.5×10^5 cells/ml 的 GK 細胞種於 24-well plate overnight 後，每個 well 利用 1 μl InvitrogenTM 之 lipofectamine 2000，分別將 0.7 μg 的 pGL3、pGL3-CD9-1.2 K、pGL3-CD9-2.6 K 等質體轉染入 GK 細胞中，且同時各轉染 0.07 μg 的 pRL-CMV 作為 internal control，18 小時後分別加入適當濃度之 poly (I:C)，每一濃度三重覆，一組不添加作為 control，6 小時後進行 luciferase assay 的測定。測定前，自 kit 中取出藥劑，事先配好 1X PLB、LARII 及 1X Stop & Glo reagent。測定時，首先以 PBS 清洗一遍，每一個孔加入 100 μl 1X PLB，置於 shaker 上均勻搖晃 15 分鐘使

細胞完全溶解，將已完全溶解細胞的 PLB 移至 eppendorf 中，離心 3,000 rpm，5 分鐘，取 20 μ l 加入已於每個孔已添加 100 μ l LARII 的 96 孔盤中，測定 firefly luciferase 10 秒，再加入 1X Stop & Glo reagent 測量 *renilla* luciferase 讀值 10 秒後，firefly luciferase 與 *renilla* luciferase 相除以標準化。

2.10 石斑魚虹彩病毒效價(titer)測定

將 1×10^5 /ml 的 GK 細胞，每個孔取 0.5 ml 種於 48 孔細胞培養盤中，培養 overnight，使細胞貼覆形成單層細胞約七、八分滿即可進行病毒效價測定。待測病毒原液用 2% FBS L-15 培養液進行十倍續列稀釋成 $10^{-1} \sim 10^{-9}$ 濃度，接著將 48 孔培養盤中的培養液吸除，並以 PBS 清洗一次，依序加入不同稀釋倍數的病毒液 0.5 ml，培養於 28 $^{\circ}$ C，顯微鏡下每日觀察細胞病變 (cytopathic effect, CPE)，連續觀察 7 日並記錄。最後以 Reed and Muench (1938) 的方法進行病毒效價測定。

2.11 多層次 Percoll 濃度差分離

挑選形態健康具活力的魚隻，於前一天不餵食使之空腹，在水中加入 0.1 ppm 2-phenoxyethonl 麻醉後進行犧牲，取其頭腎組織 (HK) 及脾臟組織 (S)，迅速以 70%酒精、PBS 及 10% L15/FBS medium 清洗後，以細胞篩 (BD) 過濾多餘組織殘渣及雜質後，全數細胞懸浮於 4 ml 10% L15/FBS medium 中，緩慢加入上層含有 4 ml 30% Percoll、下層 4ml 50% Percoll 的 15 ml 離心管中，4 $^{\circ}$ C 500 \times g 離心 45 分鐘，白血球即含於介面層中，取出加入 10% L15/FBS medium 即進行後續實驗。計算細胞數後，將 1×10^4 個細胞種於 6 cm 培養皿中，依實驗設計加入 poly(I:C) 5 μ g/ml，於適當時間點收下總 RNA，進行後續實驗。

2.12 RNA 萃取

將石斑魚腎臟細胞 (GK) 以 10% FBS-L15 培養在 6 cm 組織培養皿 (BD) 中，每盤約加入 1×10^6 細胞加入 3 ml 10% L15/FBS 培養 overnight 後，吸去老舊的培養液，以 PBS 清洗兩次，加入含 poly(I:C) 的 10% L15/FBS 培養液，依實驗設計的時間點收集細胞的總 RNA。各時間點的細胞收集，首先吸除細胞培養液並加入預冷的 PBS 清洗，吸除後以 1 ml TRIzol® 試劑 (Invitrogen)，迅速搖晃使

其覆蓋所有的細胞，以 pipetman 輕沖組織培養皿底部並將組織培養皿內溶液收集至 1.5 ml 微量離心管中，加入 200 μ l 之 chloroform，vortex 15~20 秒以混勻溶液後置於冰上 5 分鐘。以 12,000 \times g 離心 15 分鐘，將上清液(約 350 μ l) 取至另一新的微量離心管中，加入 500 μ l isopropanol，上下反轉數次，置於室溫作用 5 分鐘。12,000 \times g 離心 10 分鐘，除去上清液，加入 1 ml 70% DEPC-treated 酒精清洗 RNA 沈澱物，vortex 後 7,500 \times g 離心 5 分鐘。去除上清液，重覆酒精清洗的動作，離心去上清液後，稍微風乾 RNA 約 5~10 分鐘，加入 40 μ l DEPC-treated ddH₂O 回溶。

2.13 RT-PCR

以點帶石斑魚腎臟細胞萃取所得之總 RNA 為模板，取 0.5 μ g RNA 混以 1 μ l 10 μ M dNTP 及 50 pmole oligo dT₍₂₀₎ 作為引子，加入 DEPC treated ddH₂O 補至反應體積 12 μ l，於 65 $^{\circ}$ C 下作用 5 分鐘後，立即插冰上，再加入事先配好的 4 μ l 5X First strand buffer、2 μ l 0.1 M DTT、HiScript I Reverse Transcriptase 及 DEPC treated ddH₂O 混合物 8 μ l，使最終反應體積為 20 μ l，於 42 $^{\circ}$ C 作用 30 分鐘，70 $^{\circ}$ C 作用 15 分鐘，即完成 cDNA 的合成。取 2 μ l 合成好之 cDNA，各加入前置及反置引子 1 μ l，並混合 25 μ l EconoTaq 2X Master Mix，補 ddH₂O 至 50 μ l，均勻混合後，94 $^{\circ}$ C 作用 2 分鐘，預先打開 cDNA，然後執行 PCR 增幅目標片段於 94 $^{\circ}$ C 變性 30 秒，CD9、 β -actin 及 IFN α 以 58 $^{\circ}$ C 黏合 30 秒，Mx 以 53 $^{\circ}$ C 黏合 30 秒，皆以 72 $^{\circ}$ C 延長 30 秒計 35 個循環，最後以 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘終止，降溫到 20 $^{\circ}$ C 結束。

第三章、結果



3.1 點帶石斑魚 CD9 啟動子選殖與轉錄因子結合位分析

為了了解點帶石斑魚 CD9 基因與 IFN 的關聯，根據本實驗室楊政霖學長所獲得的 cDNA 全長序列設計了 2 個引子，利用染色體步移技術 (genome walking) 取得不同長度的 CD9 啟動子約 1.2 Kb 及 2.6 Kb (圖一)。將此兩段啟動子進行 TA cloning 後定序，得知啟動子大小分別為 1, 203 bp 及 2, 567 bp，然而兩段序列重覆之處帶有 22 bp 的差異，推測可能為不同類型的 CD9 基因。將 1.2 Kb 及 2.6 Kb 之序列利用 TFsearch、TESS、Softberry 之 NSITE 分析轉錄因子結合位，發現 1.2 Kb 和 2.6 Kb 重覆序列之中，可能含有 IRF-1、IRF2、NF- κ B、TNF- α -Y-BOX、AP-1、AP-2、C/EBP 與 ApoD 之結合位 (圖二)，其中 IRF-1、IRF2 和 NF- κ B 可引發 IFN 的表現，進而調控下游蛋白的產生以達到抗病效果。

3.2 點帶石斑魚 CD9 啟動子的活性分析

3.2.1 Poly(I:C) 對點帶石斑魚 CD9 啟動子的活性分析

利用取得之 1.2 Kb 及 2.6 Kb CD9 啟動子序列，設計帶限制酶切位之專一性引子 (表一)，並建構含 1.2 Kb 及 2.6 Kb CD9 啟動子之報導表現載體，命名為 pGL3-CD9-1.2 K 及 pGL3-CD9-2.6 K。

將所構築之報導表現載體 pGL3-CD9-1.2 K 及 pGL3-CD9-2.6 K 轉染至 GK 細胞，並施以 0.1、1、10、100、1,000、10,000 ng/ml 的 poly (I:C)，進行冷光酵素的測定，以 pGL3 作為控制組，發現 1.2 Kb 啟動子活性平均高於 2.6 Kb 啟動子活性約 6 倍，但啟動子皆不因不同濃度 poly(I:C) 的添加而有顯著的差異(圖三 A)。

將 pGL3-CD9-1.2 K 及 pGL3-CD9-2.6 K 轉染至 GB 細胞，並添加 1、10、100、1,000、10,000 ng/ml 的 poly (I:C)，進行冷光酵素的測定，以 pGL3 作為控制組，發現 1.2 Kb 啟動子活性平均高於 2.6 Kb 啟動子活性約 7 倍，但啟動子皆不因不同濃度 poly(I:C) 的添加而有顯著的差異(圖三 B)。



3.2.2 點帶石斑魚 CD9 啟動子刪除分析

3.2.2.1 點帶石斑魚不同長度之 CD9 啟動子分析

為了確認預測之啟動子轉錄因子結合位的真實性，進行了啟動子刪除分析。利用 CD9 啟動子 2.6 Kb 及 1.2 Kb 的序列各另行設計 4 個 primer 進行 PCR，並分別構築出含 2, 208、1, 868、1, 529、1, 188 bp 及 1, 097、821、679、400 bp 大小 CD9 啟動子之報導表現載體，其中 1, 097 為 3' 端刪除，其餘皆為 5' 端刪除，分別命名為 pGL3-CD9-2208 bp、pGL3-CD9-1868 bp、pGL3-CD9-1529 bp、pGL3-CD9-1188 bp、pGL3-CD9-1097 bp、pGL3-CD9-821 bp、pGL3-CD9-679 bp、pGL3-CD9-400 bp。

將上述建構之 8 個不同大小 CD9 啟動子之報導表現載體及 pGL3-CD9-1.2 K、pGL3-CD9-2.6 K 轉染於 GK，在 2.6 Kb CD9 啟動子的刪除分析中，2, 208 bp 啟動子的活性較 2.6 Kb 增加約 7 倍，並隨著啟動子序列持續的刪除，而有活性遞增的趨勢，但刪除至與 1.2 Kb 長度相近的 1, 188 bp 時，其活性則略低於 1.2 Kb (圖四 A)。故推論在 2.6 Kb 多於 1.2 Kb 的序列中，可能隱含負調控因子的結合位。

1.2 Kb CD9 啟動子的刪除實驗中，於 3' 端刪除 124 bp 的 1097 bp CD9 啟動子，其活性降低為 1.2 Kb 的 31 %；自 5' 端刪除的 821 bp CD9 啟動子，活性提高為 1.2 Kb 的 163.94 %；679 bp 活性則降為 1.2 Kb 的 136.92 %；更進一步刪除，400 bp 之 CD9 啟動子活性大幅降低至 1.2 Kb 的 12.04 % (圖四 B)，可見在 400 bp 與 679 bp 兩段長度的啟動子之間，含有重要調控 CD9 表現的轉錄因子結合位。

3.2.2.2 不同濃度 poly(I:C) 對 GK 細胞中點帶石斑魚不同長度 CD9 啟動子的影響

將刪除實驗中所獲得之不同大小的 CD9 啟動子轉染於 GK 細胞，並添加 10 ng/ml 及 100 ng/ml 的 poly(I:C)，測定其冷光酵素的表現情形，得知上述濃度均不造成顯著差異 (圖五)。此實驗 (圖五 A) 唯與 2.6 Kb 和 1.2 Kb 啟動子刪除分析實驗中 (圖四 A) 不同的是 1, 868 bp 活性未介於 2, 208 bp 及 1, 529 bp 的活性之間。

3.2.2.3 GIV 的感染對在 GK 細胞中不同長度的點帶石斑魚 CD9 啟動子活性影響

為了了解 GIV 的感染是否對 CD9 啟動子活性造成影響，將刪除實驗中所獲得之不同大小 CD9 啟動子的報導表現載體轉染於 GK 細胞，並感染 GIV (MOI = 10) 經 9 小時後測定冷光酵素的表現，感染 GIV 之各長度啟動子表現量均非常低，均不到 1.2 Kb CD9 啟動子活性之 5% (圖六)。

3.2.2.4 共同轉染石斑魚 *c-rel* 基因對點帶石斑魚 CD9 啟動子活性的影響

在轉錄因子結合位之分析中，預測在 CD9 啟動子 1.2 Kb 及 679 bp 之間的片段上，可能含有 NF- κ B 之結合位，故取 pGL3-CD9-1.2 K 及 pGL3-CD9-679 bp 分別共同轉染本實驗室 2000 年所選殖出的點帶石斑魚 *c-rel* 基因表現載體 pcDNA3CF-*c-rel* (林，2010) 於 GK 細胞，以期證明 CD9 可受 NF- κ B 調控。

本實驗中，首先共同轉染以相較於 CD9 啟動子量 (0.7 μ g) 的 0.02 倍 (0.014 μ g)、0.04 倍 (0.028 μ g)、0.1 倍 (0.07 μ g) 及 0.2 倍 (0.14 μ g) 之 *c-rel* 基因。發現共同轉染 *c-rel* 的 1.2 Kb 啟動子活性，皆低於未共同轉染之活性，平均為未添加的 1.2 Kb CD9 啟動子之 27%，皆有顯著差異；679 bp CD9 啟動子共同轉染 *c-rel* 後之活性，則在添加 0.02 倍 (0.014 μ g) 者，降低為 679 bp CD9 啟動子的 34%，但隨著 *c-rel* 量的增加，而有越來越高的活性表現，其中以 0.02 倍 (0.014 μ g)、0.04 倍 (0.028 μ g) 及 0.2 倍 (0.14 μ g) 者與 679 bp 間有顯著差異，且共同轉染 *c-rel* 0.2 倍時，其活性已高於未共同轉染之活性 (圖七 A)。

為了找出 *c-rel* 最佳的劑量，再一次以相較於 CD9 啟動子量 (0.7 μ g) 的 0.5 倍 (0.35 μ g)、1 倍、2.5 倍 (1.75 μ g)、5 倍 (3.5 μ g) 之 pcDNA3CF-*c-rel* 共同轉染於 GK 細胞，另有一組別共同轉染 1 倍 (0.7 μ g) 的 pcDNA3CF 作為控制組。由結果得知，單純 pcDNA3CF 的添加即可造成 1.2 Kb CD9 啟動子活性些微的降低，共同轉染 0.5 倍 (0.35 μ g) 的 *c-rel* 與 pcDNA3CF 有相同的效應，而隨著 *c-rel* 量的提高，活性遞增，於 *c-rel* 量增至 CD9 量的 2.5 倍 (1.75 μ g) 時，活性可高達 pcDNA3CF 組的 240%，但當 *c-rel* 量增至 CD9 量的 5 倍 (3.5 μ g) 時，活性相較於 2.5 倍量 (1.75 μ g) 不增反減，其中以共同轉染 1 倍 (0.7 μ g) 及 2.5 倍 (1.75 μ g) *c-rel* 量的 1.2 Kb CD9 啟動子相較於未共同轉染 *c-rel* 者有顯著差異；另外，

pcDNA3CF 的添加一樣對 679 bp CD9 啟動子造成些微的抑制效應，但共同轉染 *c-rel* 均使活性提高，且隨量的增加遞增，亦一樣在 5 倍 (3.5 μg) 量時，活性不增反降。*c-rel* 的共同轉染均與未共同轉染者有顯著差異。此外，共同轉染 *c-rel* 之 679 bp CD9 啟動子活性均分別較 1.2 Kb 共同轉染 *c-rel* 相同濃度者活性高 (圖七 B)。

3.3 RT-PCR

3.3.1 Poly(I:C) 處理不同時間後之點帶石斑魚內生性 CD9 於 GK 細胞的表現分析

冷光酵素的測定中，poly(I:C) 均不影響選殖之 CD9 啟動子活性的表現。為了驗證 poly(I:C) 對內生性 CD9 基因的效應，於 GK 細胞添加 100 ng/ml 的 poly(I:C)，分於 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 小時收下其總 RNA，進行 RT-PCR 後，得知 100 ng/ml 濃度 poly(I:C) 的添加，並不使內生性 CD9 的表現有所變化 (圖八 A)。

另外於 GK 細胞各添加 1、10、100、1,000、10,000 ng/ml 濃度之 poly(I:C)，各於 5 hr、10 hr 收下其總 RNA，進行 RT-PCR，發現不同時間、不同劑量的 poly(I:C) 均不對內生性 CD9 的表現產生影響 (圖八 B)。

3.3.2 Poly(I:C) 處理點帶石斑魚 HK 和 Spleen 白血球細胞對內生性 CD9、IFN 及 Mx 基因在不同時間點的表現影響

將點帶石斑魚麻醉後，取其頭腎組織及脾藏組織利用多層次 Percoll 濃度差分離法進行白血球細胞的純化，得到不規則但近圓形或橢圓形之白血球細胞，靜置後沉於培養液底部。將細胞施以 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poly(I:C)，分別在 3、6、9、12、36 小時後收集細胞的總 RNA，進行 RT-PCR。其中在未添加及添加 poly(I:C) 5 小時後，觀察細胞形態，並無明顯變化，48 小時後，HK 白血球細胞開始有部份死亡浮起而懸浮於培養液中 (圖九 A)，Spleen 白血球細胞死亡時，於培養皿底部產生細而短之黑色條狀物。

由結果得知，CD9 在 HK 白血球細胞的表現在 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poly(I:C) 處理後，並不隨著時間點而有所改變 (圖九 B)，在 Spleen 白血球細胞亦如此 (圖九 C)。IFN

在 HK 白血球細胞添加 poly(I:C) 後，相較於未添加 poly(I:C) 的控制組，在 6 小時有明顯較高的表現量，9 小時得到最好的表現，從 12 小時開始則逐漸減弱(圖九 D)；在 Spleen 白血球細胞中，poly(I:C) 添加 3 小時後 IFNa 表現量較高，在之後的時間點便降低表現量 (圖九 E)。Mx 在 HK 白血球施以 poly(I:C) 後有表現量的提升，且在 6 小時達到高峰 (圖九 F)；Mx 在 Spleen 白血球施以 poly(I:C) 添加 3 小時後，表現量較高 (圖九 G)。

第四章、討論

為了了解 CD9 與 GIV 和 IFN 的關係，以本實驗室獲得之點帶石斑魚 CD9 cDNA，利用 genome walking 的技術，取得 CD9 啟動子不同大小的序列，進行轉錄因子結合位的分析後，預測 CD9 啟動子序列中，含有 IRF1、IRF2、TNF- α -Y-BOX、NF- κ B、C/EBP、AP-1、ApoD 之結合位。其中 IRF1 在人類可活化 IFN- α 、IFN- β 的轉錄作用(Mamane et al., 1999; Taniguchi et al., 2001)，而在小鼠也證實誘發 IFN- α 、IFN- β 基因之雙股 RNA 需要 IRF1，且 IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 可引發 IRF1 活化其他基因的轉錄 (Huang et al., 2009; Saha et al., 2010)，此外，IRF1 也參與調控 apoptosis (Gao et al., 2010) 及腫瘤的抑制 (tumor-suppression) (Cavalli et al., 2010)。IRF2 可競爭性地抑制 IRF1 活化 IFN- α 、IFN- β 或其他基因的調控路徑 (Taniguchi et al., 2001)。TNF- α 為巨噬細胞所分泌，可與相關受體結合而產生功能，參與諸多生物作用的調控，如細胞的增生、分化、凋亡、脂質代謝與凝結，被認為與許多疾病及癌症相關(Aroor et al., 2013)。NF- κ B 在許多訊息傳遞過程中扮演重要角色，參與諸多生物反應，如：發炎反應、細胞凋亡、壓力反應、角膜傷口療癒與血管、淋巴管的生成，也可刺激 TNF- α 進一步活化其他免疫物質，亦使 TNF- α 促進角膜細胞凋亡 (Napetschnig and Wu, 2013)。可受許多胞內或胞外刺激活化，如細胞激素、紫外光的照射、細菌或病毒產物等，活化後進入細胞核內刺激一連串基因的表現。C/EBP 在人類除了與調控體重恆定相關外，亦可與 CDK2 (cyclin dependent kinase 2) 及 CDK4 產生交互作用，進而抑制上述 kinases 造成培養細胞的抑制生長 (growth arrest) (Wang et al., 2001)。AP-1 基因可表現與病毒蛋白高度相似的蛋白，其蛋白可與特定標的 DNA 序列作用而調節其他基因的表現 (Yu et al., 2013)。ApoD 為 apolipoprotein D 的結合位，apolipoprotein D 可終止細胞的成長分化，促進受到氧化壓力的癌細胞凋亡 (Do Carmo et al., 2002)。有研究認為細菌所生成之 serralyisin 會透過 PAR-2 活化 AP-1、C/EBP 與 NF- κ B 的結合並引起發炎反應 (Kida et al., 2007)。Wang 2011 年指出，IPNV 的感染，可提高 IRF1、IRF2、NF- κ B 及 C/EBP β 的表現量，並提出 TNF- α 為影響這些基因的最主要因子，認為 IPNV 感染後，會引發一連串由 TNF- α /NF- κ B 所調控的訊息傳遞。因此由轉錄因子結合位的預測推論，CD9 可能與抗病反應中的 IFN、TNF- α 及 NF- κ B 有關。

由 1.2 Kb CD9 及 2.6 Kb CD9 啟動子的活性分析 (圖三) 得知，在沒有任何刺

激的情形下，1.2 Kb 即有一定的表現，2.6 Kb CD9 表現量極低，近乎不表現，而 CD9 啟動子的刪除實驗中，2.6 Kb CD9 隨著序列的刪除活性遞增，因此推測 2.6 Kb CD9 可能隱含有負調控因子的結合位；1.2 Kb CD9 於 3' 端刪除 124 bp，活性降低為 1.2 Kb CD9 的 31%，679 bp 活性較 1.2 Kb CD9 高約 36%，400 bp CD9 啟動子活性降低為 1.2 Kb 之 12% (圖四)，故認為在 5' 端 400 bp ~ 679 bp 之間，及 3' 端的 1 ~ 124 bp 序列中，具有影響 CD9 表現的重要轉錄因子結合位。與轉錄因子結合位分析的預測相比對，在 3' 端之 124 bp 中，與抗病反應較相關的因子為 IRF1、IRF2 的結合位，而在 400 bp ~ 679 bp 之間則有 TNF- α -Y-BOX 的結合位，因此推測 CD9 的表現可能受到 IRF1、IRF2 及 TNF- α 的調控。

已知 1.2 Kb CD9 及 2.6 Kb CD9 不受不同濃度 poly(I:C) 的影響，在建構不同長度之 CD9 啟動子報導表現載體並完成活性測試後，進一步添加 poly(I:C) 後發現不同大小的 CD9 啟動子皆不受 poly(I:C) 的影響 (圖五)。於是以 GIV (MOI = 10) 感染 GK 細胞，測試不同長度 CD9 啟動子是否受到影響，感染 GIV 後，CD9 啟動子近乎不表現活性 (圖六)，因此認為 GIV 的感染可能會抑制 CD9 在 GK 細胞的表現，也因許多研究提出病毒可能"劫持"四穿膜蛋白作為進入細胞、傳遞和離開細胞的媒介，故提出假設，GIV 感染 GK 細胞後，可能"劫持" CD9 以協助病毒的複製。若綜合轉錄因子結合位分析，在 CD9 啟動子序列中可能含有 NF- κ B 的轉錄因子結合位，有研究指出，感染 IBDV 的細胞，在病毒複製早期，會抑制 NF- κ B 的活化，使 apoptosis 無法進行，因此感染 GIV 後，造成 CD9 啟動子表現的劇降，也顯得合理。另一方面，不排除這樣的結果也可能起因高效價 GIV 9 小時的感染後，細胞已遭受 GIV 嚴重破壞，而無法偵測到報導酵素的活性。往後的實驗中，將可嘗試較低效價如 MOI = 1 或 0.01，或減少感染 GIV 的時間，以期看到 GIV 真正影響 CD9 的效應。

由於在 CD9 啟動子轉錄因子結合位分析中，預測有 NF- κ B 的結合位，因此取可能含有 NF- κ B 的結合位的 1.2 Kb CD9 啟動子及不含 NF- κ B 結合位的 679 bp CD9 啟動子，並以本實驗室 2000 年建構之 pcDNA3CF-*c-rel* 載體共同轉染於 GK 細胞中，以期了解 *c-rel* 蛋白的表現，是否可促進 CD9 啟動子活性。由不同量 *c-rel* 的共同轉染結果顯示，0.14 μ g 或更少量的 *c-rel* 不但無法促進 1.2 Kb CD9 的表現，反而降低 1.2 Kb CD9 的啟動子活性，這可能因共同轉染的質體對報導基因所

造成的抑制效應 (*trans effect*)^R，由添加 pcDNA3CF 的組別即可證明之。當 *c-rel* 量提高至 0.7 μg 時，可能因 *c-rel* 的效應遮蓋了抑制效應，而與不共同轉染 *c-rel* 之 1.2 Kb CD9 之間無顯著差異，提高至 1.75 μg 時，其活性最強，為共同轉染 pcDNA3CF 組別的 2 倍。679 bp CD9 共同轉染 *c-rel* 0.014 μg 時，可能一樣受到抑制效應所影響，而有較低表現，但隨著量的增加，不斷提高其活性，但增加至 3.5 μg ，活性不增反減，可見 1.75 μg 的 *c-rel* 是對 679 bp CD9 較佳的劑量 (圖七)，由此結果得知，*c-rel* 可促進 679 bp CD9 及 1.2 Kb CD9 的表現，其中 679 bp CD9 對 *c-rel* 較為敏感，因不同量的共同轉染而有明顯變化，而 1.2 Kb 則需要 0.7 μg 以上的 *c-rel* 才有促進效應。猜測這樣的結果，可能因 1.2 Kb CD9 較 679 bp CD9 大，且含有其他未知可能略微影響活性表現的調控因子結合位，但令人意外的是，不帶有 NF- κ B 結合位之 679 bp CD9 活性在 *c-rel* 的共同轉染下，竟有較高的表現，推論現在轉錄因子結合位的資料庫中，多以人類、哺乳類為主，魚類仍佔少數，可能在 679 bp CD9 啟動子的序列中，具有未被分析出，而可能影響 CD9 表現的結合位。

在一系列的冷光酵素測定實驗中，不同濃度的 poly(I:C) 均不對選殖之 CD9 啟動子在 GK 細胞中產生影響。或許 GK 細胞並不具備可調控表現 CD9 的環境，因此再以 RT-PCR 的方式試圖驗證 poly (I:C) 添加於 GK 細胞後，是否會影響內生性 CD9 之表現，果然結果顯示內生性 CD9 在 GK 細胞中，在不同時間點均不受不同濃度的 poly(I:C) 影響。因此進一步犧牲點帶石斑魚活體，取得頭腎及脾臟組織中的白血球細胞來進行 CD9 的表現測試，在培養的過程中，發現 HK 白血球細胞在 48 小時開始有部份死亡的現象，Spleen 白血球細胞則於培養 48 小時後全數死亡，由此得知，往後若進行相關實驗，若未經特殊處理，白血球細胞的實驗過程可能不宜進行超過 48 小時。利用 poly(I:C) 處理 HK 和 Spleen 白血球細胞，檢驗其對內生性 CD9 基因的效應，並同時測定 IFN 及 Mx 對 poly(I:C) 的反應，內生性 CD9 依舊不受到 poly(I:C) 的影響，但點帶石斑魚 IFN 在 HK 白血球細胞的表現則隨著時間點的增長，在 6-9 小時達到高峰後，在 12 及 36 小時逐漸降低了表現量。Mx 在 HK 白血球細胞因 poly(I:C) 的添加在 6 小時得到較好的表現，由此結果也可推測 IFN α 可能具有調控 Mx 表現之功能。此外，IFN α 在 HK 白血球細胞中於 9 小時達到最高的表現，亦即 poly(I:C) 可以促進 HK 白血球細胞對 IFN α


的表現，然而在所有的時間點 CD9 無表現上的差異，由此推測，IFN α 並不影響 CD9 的調控。

本研究確立在點帶石斑魚 GK 細胞、GB 細胞、HK 白血球細胞及 Spleen 白血球細胞中，不受任何刺激，內生性 CD9 及選殖之 CD9 啟動子皆會有一定量的表現，可能因 CD9 四穿膜蛋白本身具備參與許多細胞作用的特性，而在膜上有一定量的分佈，以維持細胞正常功能的運作。根據轉錄因子結合位的分析，CD9 可能與抗病反應有關，然而不同時間點、不同濃度的 poly(I:C) 及在 GK 細胞、GB 細胞，甚至與免疫最有直接關係的 HK、Spleen 白血球細胞，都不見其表現因 poly(I:C) 的添加而有所差異，而 GIV 的感染使 CD9 啟動子表現劇降，唯透過 *c-rel* 的共同轉染於 GK 細胞中，得知 679 bp CD9 會受到促進表現，較高量的 *c-rel* 亦可增加 1.2 Kb CD9 啟動子的表現。因此僅能確認，CD9 與 NF- κ B 有關，且可能會受到 NF- κ B 的促進調控。然本實驗室 2011 年吳與劉之成果顯示，於點帶石斑魚活體施打 poly(I:C) 後，CD9 於一天後即有大量的表現，Zhang 在 2012 年指出，漿細胞樣樹突細胞 (pDCs) 需透過與被 HCV 感染的細胞間的交互作用，才可誘導 IFN- α ，且四穿膜蛋白與細胞間的交互作用有密切關係，綜合本實驗室 2011 年的成果，認為細胞可能需與受感染的細胞產生交互作用，才可能使 CD9 提高表現，也基於本實驗室 2011 年之成果乃於活體中進行，活體中的免疫反應極為複雜，其中所牽涉之細胞種類與因子甚廣泛，可能隱含在單一細胞中不具備的因子，使 CD9 在培養細胞的實驗上無法看見促進調控的效應。

另外，CD9 屬四穿膜蛋白家族成員，四穿膜蛋白易與其他相同或相異的四穿膜蛋白及其他伴護蛋白共同形成四穿膜蛋白網絡，因此，作用的產生可能常牽涉與其他四穿膜蛋白的交互作用，未來在定義 CD9 角色的研究中，應將其他可能參與反應之四穿膜蛋白一併列入考慮才可盡善盡美。

綜合本研究成果，認為 CD9 與 NF- κ B 有關，可能在感染 GIV 後，受到抑制，但 CD9 與 NF- κ B 及 GIV 確切的交互作用及 CD9 的表現是否與其他因子有關仍有待進一步證實。

參考文獻

- 
- 劉文御 (2003)。養殖水產生物病害防治。行政院農業委員會水產試驗所。
- 冉繁華 (2007)。石斑 *Handbook of Grouper*。台灣漁業經濟發展協會。
- 張文重 (2009)。水產種苗培育技術。前程出版社。
- 行政院農業委員會漁業署 (2012) 2011 年漁業年報。高雄市:行政院農業委員會漁業署, p. 37。
- 林珮玟 (2010)。石斑魚虹彩病毒極早期基因 078R 和 030L 之功能分析。國立台灣海洋大學生物科技研究所博士學位論文。
- 楊政霖 (2012)。點帶石斑魚 CD9 基因之選殖、特性鑑定及感染虹彩病毒之表現分析。國立台灣大學生命科學院漁業科學所碩士論文。
- Aroor, A. R., McKarns, S., Demarco, V. G., Jia, G. and Sowers, J. R. (2013). Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. *Metabolism*. pii: S0026-0495(13)00209-6.
- Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2001). Tetraspanins. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1189-1205.
- Cavalli, L. R., Riggins, R. B., Wang, A., Clarke, R., Haddad, B. R. (2010). Frequent loss of heterozygosity at the interferon regulatory factor-1 gene locus in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*121(1), 227–231.
- de Kneegt, R. J., and van den Berg, A. P. (2001). Hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 345, 1427; author reply 1427-1428.
- de Parseval, A., Lerner, D. L., Borrow, P., Willett, B. J., and Elder, J. H. (1997). Blocking of feline immunodeficiency virus infection by a monoclonal antibody to CD9 is via inhibition of virus release rather than interference with receptor binding. *J. Virol* . 71, 5742-5749.
- Do Carmo, S., Séguin, D., Milne, R. and Rassart, E. (2002). Modulation of

Apolipoprotein D and Apolipoprotein E mRNA Expression by Growth Arrest and Identification of Key Elements in the Promoter. *J. Biol. Chem.* 277(7), 5514–5523.

Fukudome, K., Furuse, M., Imai, T., Nishimura, M., Takagi, S., Hinuma, Y., and Yoshie, O. (1992). Identification of membrane antigen C33 recognized by monoclonal antibodies inhibitory to human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-induced syncytium formation: altered glycosylation of C33 antigen in HTLV-1-positive T cells. *J. Virol.* 66, 1394-1401.

Gao, J., Senthil, M., Ren, B., Yan, J., Xing, Q., Yu, J., Zhang, L., and Yim, J. H. (2010). IRF-1 transcriptionally up-regulates PUMA which mediates the mitochondrial apoptotic pathway in IRF-1 induced apoptosis in cancer cells. *Cell Death Differ.* 17(4), 699-709.

Garcia, E., Nikolic, D. S. and Piguet, V. (2008). HIV-1 replication in dendritic cells occurs through a tetraspanin-containing compartment enriched in AP-3. *Traffic.* 9(2), 200-214.

Gluschankof, P., Mondor, I., Gelderblom, H. R., and Sattentau, Q. J. (1997). Cell membrane vesicles are a major contaminant of gradient-enriched human immunodeficiency virus type-1 preparations. *Virology.* 230, 125-133.

Hemler, M. E. (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 397-422.

Hemler, M. E. (2005). Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 801-811.

Huang, Y., Walstrom, A., Zhang, L., Zhao, Y., Cui, M., Ye, L., Zheng, J. C. (2009). Type I Interferons and Interferon Regulatory Factors Regulate TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) in HIV-1-Infected Macrophages. *PLoS ONE.* 4(4), e5397.

Kaji, K., Oda, S., Shikano, T., Ohnuki, T., Uematsu, Y., Sakagami, J., Tada, N.,

Miyazaki, S. and Kudo, A. (2000) The gamete fusion process is defective in eggs of CD9-deficient mice. *Nat. Genet.* 24, 279–282.

Khurana, S., Kremmentsov, D. N., de Parseval, A., Elder, J. H., Foti, M. and Thali, M. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 and influenza virus exit via different membrane microdomains. *J. Virol.* , 81(22), 12630-12640.

Kida, Y., Inoue, H., Shimizu, T. and Kuwano, K. (2007). *Serratia marcescens* serralyisin induces inflammatory responses through protease-activated receptor 2. *Infect. Immun.* 75(1): 164–174.

Kremmentsov, D. N., Weng, J., Lambele, M., Roy, N. H. and Thali, M. (2009). Tetraspanins regulate cell-to-cell transmission of HIV-1. *Retrovirology* . 6, 64.

Kremmentsov, D. N., Rassam, P., Margeat, E., Roy, N. H., Schneider-Schaulies, J., Milhiet, P. E. and Thali, M. (2010). HIV-1 assembly differentially alters dynamics and partitioning of tetraspanins and raft components. *Traffic*. 11(11), 1401-1414.

Kurzeder, C., Koppold, B., Sauer, G., Pabst, S., Kreienberg, R. and Deissler, H. (2007). CD9 promotes adeno-associated virus type 2 infection of mammary carcinoma cells with low cell surface expression of heparan sulphate proteoglycans. *Int. J. Mol. Med.* 19(2), 325-333.

Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M. and Boucheix, C. (2000). Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science*. 287, 319–321.

Löffler, S., Lottspeich, F., Lanza, F., Azorsa, D. O., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. (1997). CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus. *J. Virol.* 71(1), 42-49.

Mamane, Y., Heylbroeck, C., Génin, P., Algarté, M., Servant, M. J., LePage, C., DeLuca, C., Kwon, H., Lin, R., Hiscott, J. (1999). Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene*. 237, 1-14.

Martin, F., Roth, D. M., Jans, D. A., Pouton, C. W., Partridge, L. J., Monk, P. N., and Moseley, G. W. (2005). Tetraspanins in viral infections: a fundamental role in viral biology. *J. Virol.* 79, 10839-10851.

Meerloo, T., Sheikh, M. A., Bloem, A. C., de Ronde, A., Schutten, M., van Els, C. A., Roholl, P. J., Joling, P., Goudsmit, J. and Schuurman, H. J. (1993). Host cell membrane proteins on human immunodeficiency virus type 1 after *in vitro* infection of H9 cells and blood mononuclear cells. An immuno-electron microscopic study. *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 1), 129-135.

Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Suzuki, K., Kosai, K., Inoue, K., Ogura, A., Okabe, M. and Mekada E. (2000). Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science.* 287, 321-324.

Monk, P. N., Partridge, L. J. (2012). Tetraspanins-gateways for Infection. *Infect. Disord. Drug Targets.* 12(1), 4-17.

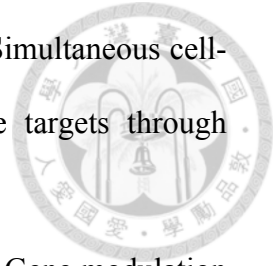
Napetschnig, J. and Wu, H. (2013). Molecular Basis of NF- κ B Signaling. *Annu Rev Biophys.* 42, 443-68.

Nydegger, S., Khurana, S., Kremontsov, D. N., Foti, M. and Thali, M. (2006). Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *J. Cell Biol.* 173(5), 795-807.

Peñas, P. F., García-Díez, A., Sánchez-Madrid, F., Yáñez-Mó, M. (2000). Tetraspanins are localized at motility-related structures and involved in normal human keratinocyte wound healing migration. *J. Invest. Dermatol.* 114(6), 1126-1135.

Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G. and Abrignani, S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science.* 282(5390), 938-941.

Rudnicka, D., Feldmann, J., Porrot, F., Wietgreffe, S., Guadagnini, S., Prevost, M. C.,



Estaquier, J., Haase, A. T., Sol-Foulon, N. and Schwartz, O. (2009). Simultaneous cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus to multiple targets through polysynapses. *J. Virol.* 83(12), 6234-6246.

Saha, B., Jyothi Prasanna, S., Chandrasekar, B. and Nandi, D. (2010). Gene modulation and immunoregulatory roles of Interferon γ . *Cytokine.* 50, 1–14.

Schmid, E., Zurbriggen, A., Gassen, U., Rima, B., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, J. (2000). Antibodies to CD9, a tetraspan transmembrane protein, inhibit canine distemper virus-induced cell-cell fusion but not virus-cell fusion. *J. Virol.* 74(16), 7554-7561.

Seigneuret, M., Delaguillaumie, A., Lagaudriere-Gesbert, C., and Conjeaud, H. (2001). Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *J. Biol. Chem.* 276(43), 40055-40064.

Shaw, M. L., Stone, K. L., Colangelo, C. M., Gulcicek, E. E. and Palese, P. (2008). Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathog.* 4(6), e1000085.

Stipp, C.S., Kolesnikova, T.V., and Hemler, M.E. (2003). Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 106-112.

Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A. and Tanaka, N. (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 623–655.

von Lindern, J. J., Rojo, D., Grovit-Ferbas, K., Yeramian, C., Deng, C., Herbein, G., Ferguson, M. R., Pappas, T. C., Decker, J. M., Singh, A., Collman, R. G. and O'Brien, W. A. (2003). Potential role for CD63 in CCR5-mediated human immunodeficiency virus type 1 infection of macrophages. *J. Virol.* 77(6), 3624-3633.

Wang, H., Iakova, P., Wilde, M., Welm, A., Goode, T., Roesler, W. J. and Timchenko, N. A. (2001). C/EBP α arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol. Cell.* 8(4), 817–828.

Wiley, R. D. and Gummuluru, S. (2006). Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103(3), 738-743.

(a) Willett, B., Hosie, M., Shaw, A., Neil, J. (1997). Inhibition of feline immunodeficiency virus infection by CD9 antibody operates after virus entry and is independent of virus tropism. *J. Gen. Virol.* 78(Pt 3), 611-618. (b) Willett, B. J., Hosie, M. J., Jarrett, O. and Neil, J. C. (1994). Identification of a putative cellular receptor for feline immunodeficiency virus as the feline homologue of CD9. *Immunology.* 81 (2), 228-33; (c) Willett, B. J. and Neil, J. C (1995). cDNA cloning and eukaryotic expression of feline CD9. *Mol. Immunol.* 32(6), 417-423.

Wu, M. S., Chen, C. W., Liu, Y. C., Huang, H. H., Lin, C. H., Tzeng, C. S. and Chang, C. Y. (2012). Transcriptional analysis of orange-spotted grouper reacting to experimental grouper iridovirus infection. *Dev. Comp. Immunol.* 37 (2), 233-42.

Yao, Y. L. and Yang, W. M. (2003). The Metastasis-associated Proteins 1 and 2 Form Distinct Protein Complexes with Histone Deacetylase Activity. *J. Biol. Chem.* 278(43), 42560-8.

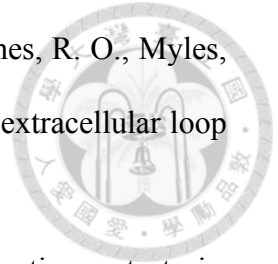
Yáñez-Mó, M., Barreiro, O., Gordon-Alonso, M., Sala-Valdés, M., Sánchez-Madrid, F. (2009). Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol.* 19(9):434-46.

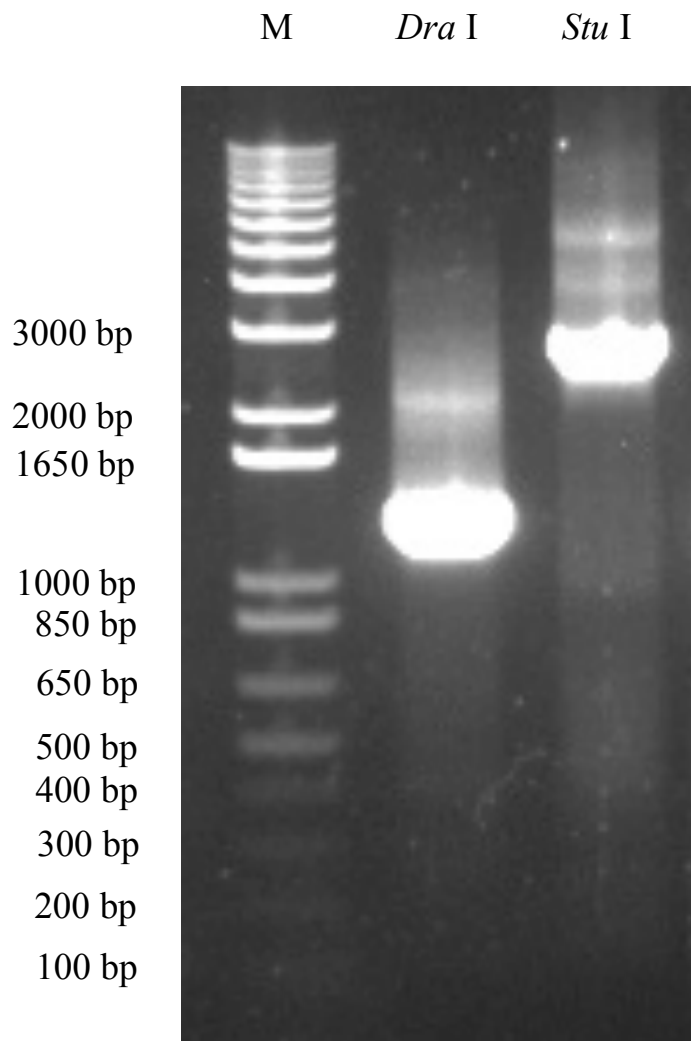
Yu, K. P., Heston, L., Park, R., Ding, Z., Wang'ondou, R., Delecluse, H. J., Miller, G. (2013). Latency of Epstein-Barr virus is disrupted by gain-of-function mutant cellular AP-1 proteins that preferentially bind methylated DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 110(20), 8176-81.

Zhang S., Kodys K., Babcock G. J, and Szabo1 G. (2012) CD81/CD9 Tetraspanins Aid Plasmacytoid Dendritic Cells in Recognition of Hepatitis C Virus–Infected Cells and Induction of Interferon-Alpha. *Hepatology.* 000, 000.

Zhu, G. Z., Miller, B. J., Boucheix, C., Rubinstein, E., Liu, C. C., Hynes, R. O., Myles, D. G. and Primakoff, P. (2002). Residues SFQ (173–175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. *Development*. 129, 1995-2002.

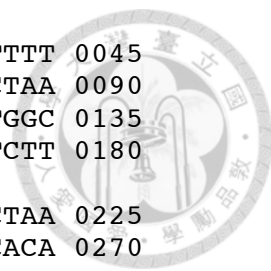
Zöller, M. (2009). Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer*. 9, 40-55.





圖一、以染色體步移 (genome walking) 技術取得點帶石斑魚不同長度之 CD9 啟動子。

使用 Clontech 的 GenomeWalker™ Universal Kit 來取得 CD9 啟動子，其中，利用 kit 所提供之 *Dra* I、*EcoR* V、*Pvu* II 及 *Stu* I 對點帶石斑魚 genomic DNA 進行切割，製成四個 DNA libraries，接上 kit 提供之 adaptor 後，進行兩次 PCR。而在 *Dra* I 及 *Stu* I libraries 的 PCR 產物中，各獲得約 1.2 Kb 及 2.6 Kb 的啟動子。M: DNA size marker。



0001 CCTGATACACACTGCTGAGGGAGATCTGCTGAAAAAACAGGTTTT 0045
 0046 GAGCCAACGACCCAGCGTCAGTGTGAAGTGTGAGGACATCACTAA 0090
 0091 CTACAGGAGACCATTCCCCCCACTGTGGAGACCCAACAACCTGGC 0135
 0136 CGACGACCTGAATGTGTTTAACTGCAAGTTTAAATGACCCCATCTT 0180
 AP-1
 0181 CACACCCCTCACCCACTCTGATTCAGACATCACATCCACACCTAA 0225
 0226 CTCAGCCAGCTCACTGTCCAGCCTCTACCTGTCAGTGGATCACA 0270
 0271 CACAACCTTCCCTGACAGACCTGGAGCTGAACAGGCTCTAAACTATG 0315
 0316 GAGATGACAATGGACTTCAGGATGAGCCCTCCATCACTGCCCCCC 0360
 0361 TCACAATGCTGAACAACACTGTGATGTGGAATCCTGTAGGTAAAG 0405
 0406 TGGACGTCCAACATCGACACCATCAGAAAAAAGGCCCAGCAGAGT 0450
 0451 ACTTCTGTGCCTGCTCAGGAGGTTTCCAGCCTCCCTTAGGAGCTGC 0495
 0496 GGAGTATTTTTAGAAACCGATGATCTACTAGGATTTTTACACACAA 0540
 0541 CCATCTCTAGGGTTTACAGAGGATGGTCCCAAAATGTCTTGTTGA 0585
 0586 TGCCAGAGGTCAGAGGAGAATAGCCAGACTGGTTCAAGATGATAG 0630
 0631 AAAGGCAACAGGAAGTCAAATAACCACTGGTTACAACCAAGGTCT 0675
 0676 GCAGAAGACCATCTCTGAAGCAACAACACCTTGTCCAACCTTGAA 0720
 0721 GCAGATGGGCTACAGCAGCAGAAGACCACACCAGGTGCCACTCCT 0765
 0766 GTCAGCTAACAAACAGGAACTGAGGCTACAGTTCACACAGGCTCA 0810
 0811 CAAAACCTGGACAATAGAAGATTGGAAAAACCACATTCGGATGGA 0855
 0856 AGCATGGATCCATCCTGCCTTGTATCAACGCTTTCAGGCTGCTGCT 0900
 0901 GGTGGTGTAAATGGTGTGGGGGAGATTTTTCTTAGTACCAACTGAGC 0945
 0946 ATGGTCTAAACACCACAGCCTACCTGAGTATTGTTGCTGACCGTG 0990
 0991 TCCATCCCTTTATGACCACAGTGTACCATCTTCTGATGGCTACT 1035
 1036 TCCAGCAGGATAACGCACCATGTCACAAAGCTCACATCATCTCAA 1080
 1081 ACATGACAATGAGTTCCTGTACTCCAATGGCCTCCACAGTCACC 1125
 1126 AGATCTCAGTCCAATAGAGCACCTTTGGGATGTGGTGGAACGGGA 1170
 1171 GATTCTCATCATGGATGTGCAGCTGACAAATCTGCAGCAACTGTG 1215
 1216 TGATGTCATCATGTCAATACGGACCAAATCTCTGAGGAATGTTT 1260
 1261 CCAGCGCCTTGTGAATCTATGACACCAAGAATTAAGGCAGCTCT 1305
 1306 GAAGGCAGAAGGGGTCCAGTGAGTGTATATAGTGATATATATATT 1350
 1351 AAAAACAAAGAGCACTGTTAAGATGTTTAAACGTATTACCAGCTG 1395
 AAACGTATTACCAGCTG
 AP-1
 1396 CTC**T**A**A**CTAAAAGATTA**A**ACAGTT**G**TGTTT**G**TGTCAGTT**G**AAAG 1440
 CTCA**A**ATACTAAAAGATTA**A**ACAGTT**G**TGTTT**G**TGTCAGTT**G**AAAG
 1441 GGATTTTTTTTAGCATCTGGCCCCAGGCATTTTCACATTATCTGT 1485
 GGATTTTTTTTAGCATCTGGCCCCAGGCATTTTCACATTATCTGT
 1486 TCTGGCCCCTGTTCAAAAACAGTCTGGACGCCCTGATACAAACC 1530
 TCTGGCCCCTGTTCAAAAACAGTCTGGACGCCCTGATACAAACC
 1531 AACAAACAACACCAGGAGTACAGACTTTGTACAAAGGTACTGCCT 1575
 AACAAACAACACCAGGAGTACAGACTTTGTACAAAGGTACTGCCT
 1576 CAGAGATACAACCAGAGCTAGAGAACGCTGTTGTCTGCTTTACAA 1620
 CAGAGATACAACCAGAGCTAGAGAACGCTGTTGTCTGCTTTACAA
 ApoD (-)
 1621 GGGTGCAATGCATCCTGTTGAATTGTGTATGTAGTTAATGTGTGT 1665
 GGGTGCAATGCATCCTGTTGAATTGTGTATGTAGTTAATGTGTGT
 ApoD (-)
 1666 TTGTGTGAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG----- 1710
 TTGTGTGAGTG
 ApoD (-) C/EBP NF-KB (-)
 1711 -----CGGTGTAGCCTACGCATGAA**TGAGGTAAGAAGAGGGG** 1755
 TGTGTGTGCGGTGTAGCCTACGCATGAA**TGAGGTAAGAAGAGGGG**

圖二、CD9 啟動子 1.2 Kb 及 2.6 Kb 序列



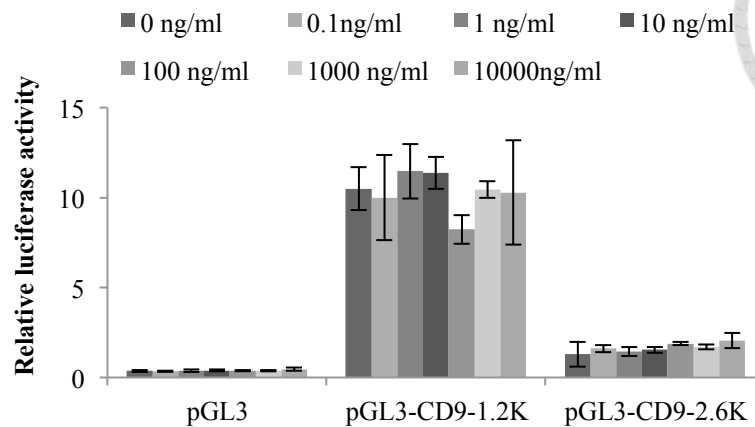
1756 GAGGGACGGATAGCACATCACACTTCCTGTCCCTTGTTCCTTTC 1800
GAGGGACGGATAGCACATCACACTTCCTGTCCCTTGTTCCTTTC
 1801 TTTGTTTTTCAGCCCAAGTTTCACATTTGCCAAATCAAACACTGTCC 1845
TTTGTTTTTCAGCCCAAGTTTCACATTTGCCAAATCAAACACTGTCC
 IRF1, IRF2
 1846 AGTGCTCTTTTAATATAGTTTCCTGCATGATAAATCTGTTCACTTC 1890
AGTGCTCTTTTAATATAGTTTCCTGCATGATAAATCTGTTCACTTC
 1891 AAAGTGTGGCTGCAGTGTGGGCTCCTGTTGGCCCATGTTTAT 1935
 TNF- α -Y-box
AAAGTGTGGCTGCAGTGTGGGCTCCTGTTGGCCCATGTTTAT
 1936 TTATGAGTTTCCTGTGATTTTTTATTCAACTCAAATCAGGTAGAAT 1980
TTATGAGTTTCCTGTGATTTTTTATTCAACTCAAATCAGGTAGAAT
 1981 AATAAAAAAAAAAAGCCCGGACTAATCTCCAAGCTGGTCCGTTTC 2025
AATAAAAAAAAAA-GCCCGGACTAATCTCCAAGCTGGTCCGTTTC
 AP-1
 2026 CTGCTATCCACCTCATAAATAACTCATCCTTTATCATTCTTGACT 2070
CTGCTATCCACCTCATAAATAACTCATCCTTTATCATTCTTGACT
 2071 CTCATTTTCCTTAGGTTTTCACTATGACTCTATGTTCTGCGGCCTCT 2115
CTCATTTTCCTTAGGTTTTCACTATGACTCTATGTTCTGCGGCCTCT
 2116 TCGCGTCTGCGCGCCGCCGCTGCTCATTGGTCCCACCTCGTGTC 2160
TCGCGTCTGCGCGCCGCCGCTGCTCATTGGTCCCACCTCGTGTC
 2161 TGTACAGCTCTCAGCCAATGGAATGCAGAGAGCGGTGAGAGAG 2205
TGTACAGCTCTCAGCCAATGGAATGCAGAGAGCGGTGAGAGAG
 2206 GCGGGGCATGACGCATGTCGGGACTGTATAACCAGCAGCTCAATG 2250
GCGGGGCATGACGCATGTCGGGACTGTATAACCAGCAGCTCAATG
 2251 TGAAATCTGTGGATGTTCCACCCTGAAACTGCACGAGGACACAG 2295
TGAAATCTGTGGATGTTCCACCCTGAAACTGCACGAGGACACAG
 2296 AGCGCGAGCGCCTTTGATCAACCAGGTATTTATGTAGTTTGAGGT 2340
AGCGCGAGCGCCTTTGATCAACCAGGTATTTATGTAGTTTGAGGT
 2341 TAGTATCTGTAGCTCGGCTGCAACATGAATTAACCTGCGCCATTGA 2385
TAGTATCTGTAGCTCGGCTGCAACATGAATTAACCTGCGCCATTGA
 2386 GATTTTTTAATGCGTTACTAACTGCTTAATACATTTACATGTCAA 2430
GATTTTTTAATGCGTTACTAACTGCTTAATACATTTACATGTCAA
 2431 ATAAAACCTTTACAGGTTTGAGTATGTGTGAATGTTTTGATGTGC 2475
ATAAAACCTTTACAGGTTTGAGTATGTGTGAATGTTTTGATGTGC
 IRF1, IRF2
 2476 CGTGCCGCAGACGGTCTGCACAAGTGATGATGTCATTTGTTTATT 2520
CGTGCCGCAGACGGTCTGCACAAGTGATGATGTCATTTGTTTATT
 2521 GTGTACACATTTACAGATCTCGCAAACACACGCAGCACAACAAC 2565
GTGTACACATTTACAGATCTCGCAAACACACGCAGCACAACAAC
 2566 CGGTGATCATTATGGC 2581
CGGTGATCATTATGGC

圖二、CD9 啟動子 1.2 Kb 及 2.6 Kb 序列

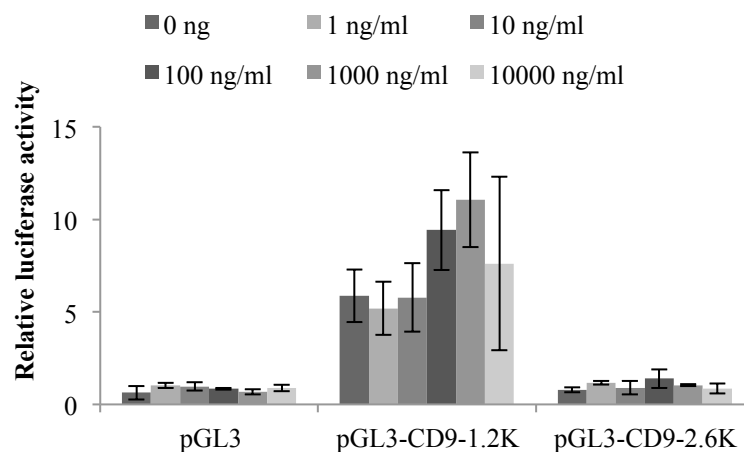
黑色字體為 CD9 啟動子 2.6 Kb 的序列，藍色字體為 1.2 Kb CD9 啟動子，紅色為兩個 CD9 之啟動子重覆而相異之處。利用 TFSearch、TESS 及 NSITE 進行轉錄因子結合位的分析，在兩個啟動子重覆的片段中，預測可能含有 AP-1、AP-2、ApoD(-)、C/EBP、NF- κ B、TNF- α -Y-BOX、IRF1 及 IRF2 之結合位。



A GK



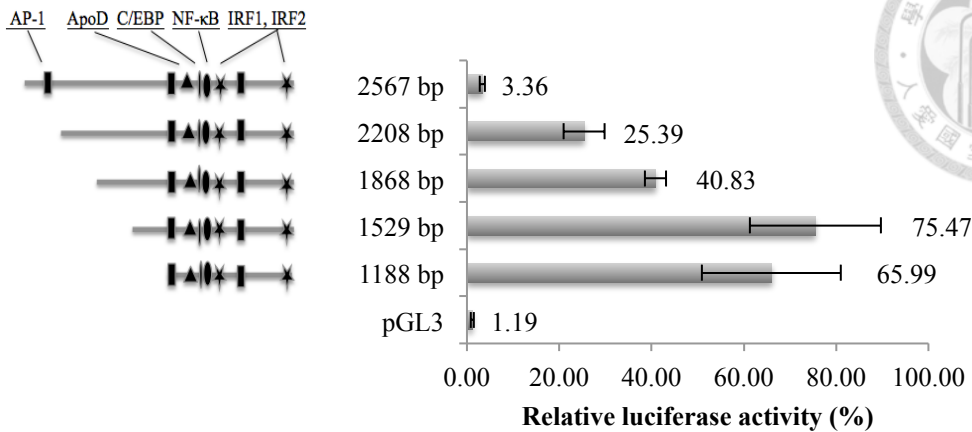
B GB



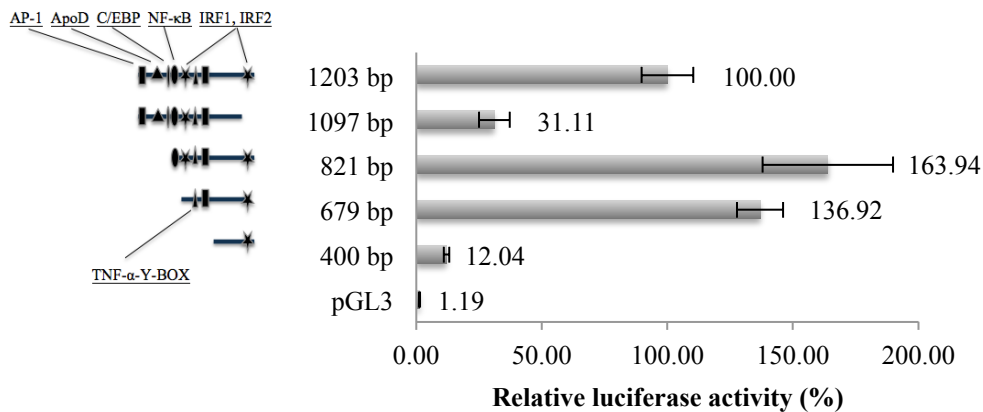
圖三、1.2 Kb 及 2.6 Kb 的 CD9 啟動子報導表現載體之活性表現及不同濃度 poly(I:C) 對 CD9 啟動子的影響。

各將 0.7 μ g 的 pGL3、pGL3-CD9-1.2 K、pGL3-CD9-2.6 K 及 0.07 μ g 的 pRL-CMV 作為 internal control，轉染於細胞中，經 18 小時後添加 poly(I:C)，6 小時後，再測定 firefly luciferase 與 *Renilla luciferase* 的表現量，兩者讀值相除後，三重覆平均 \pm 標準差。(A) CD9 啟動子報導表現載體轉染於 GK 細胞中，poly(I:C) 各添加 0.1、1、10、100、1,000、10,000 ng/ml，發現 1.2 Kb 的 CD9 啟動子表現量較 2.6 Kb 高，但各組別中 poly(I:C) 的處理並無產生顯著差異。(B) CD9 啟動子報導表現載體轉染於 GB 細胞中，各添加 1、10、100、1,000、10,000 ng/ml poly(I:C)，各組別中 poly(I:C) 的處理並無產生顯著差異。

A



B

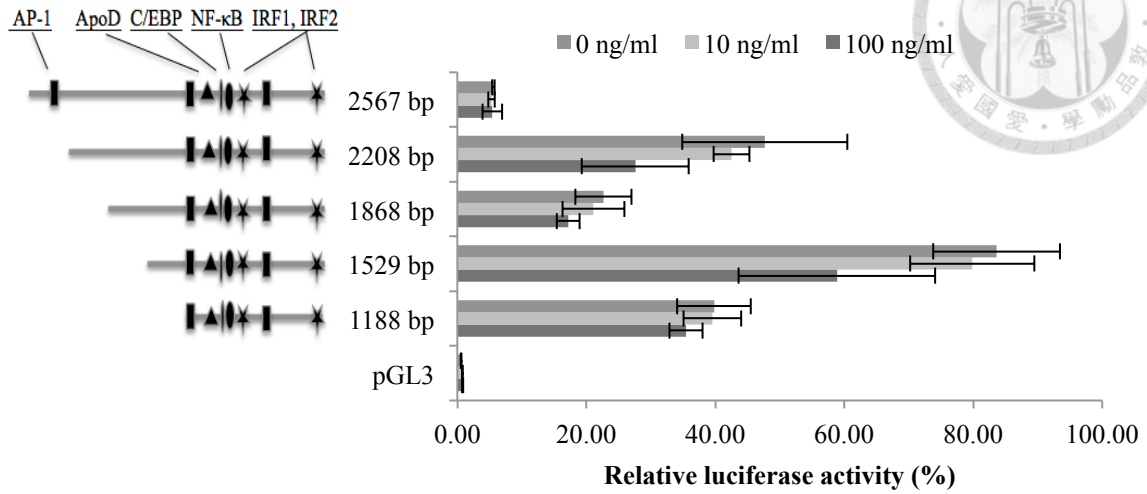


圖四、在 GK 細胞中 2.6 Kb 及 1.2 Kb CD9 啟動子的序列刪除分析(deletion)。

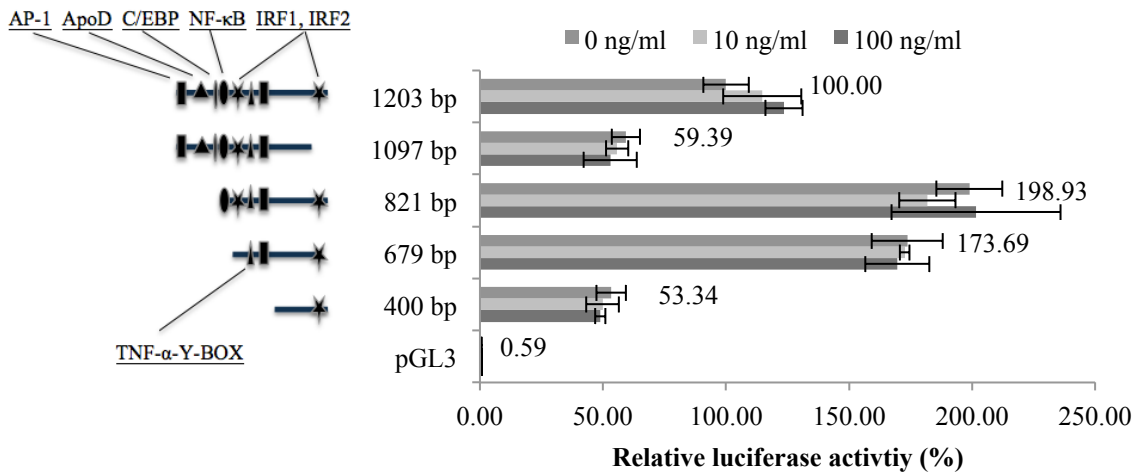
依據 1.2 Kb 及 2.6 Kb CD9 啟動子序列設計不同引子，獲得不同大小的 CD9 啟動子，各將 0.7 μg pGL3-CD9-2.6 K、pGL3-CD9-2208 bp、pGL3-CD9-1868 bp、pGL3-CD9-1529 bp、pGL3-CD9-1188 bp、pGL3-CD9-1.2 K、pGL3-CD9-1097 bp、pGL3-CD9-821 bp、pGL3-CD9-679 bp、pGL3-CD9-400 bp、pGL3 及 0.07 μg 的 pRL-CMV 作為 internal control，轉染於 GK 細胞中 24 小時後，測定 firefly luciferase 與 *Renilla* luciferase 的表現量，兩者讀值相除後，三重覆平均 ± 標準差，以 1.2 Kb CD9 啟動子活性為 100%。(A) 2.6 Kb CD9 啟動子隨著序列的刪除，活性遞增，與 1.2 Kb 大小相近的啟動子，活性則略低於 1.2 Kb。(B) 1.2 Kb CD9 啟動子隨著序列的刪除，在去除 3'端 124 bp 的 1097 bp，減為 31%，而 821 bp 和 679 bp 活性較 1.2 Kb CD9 啟動子高，400 bp 活性最低。



A



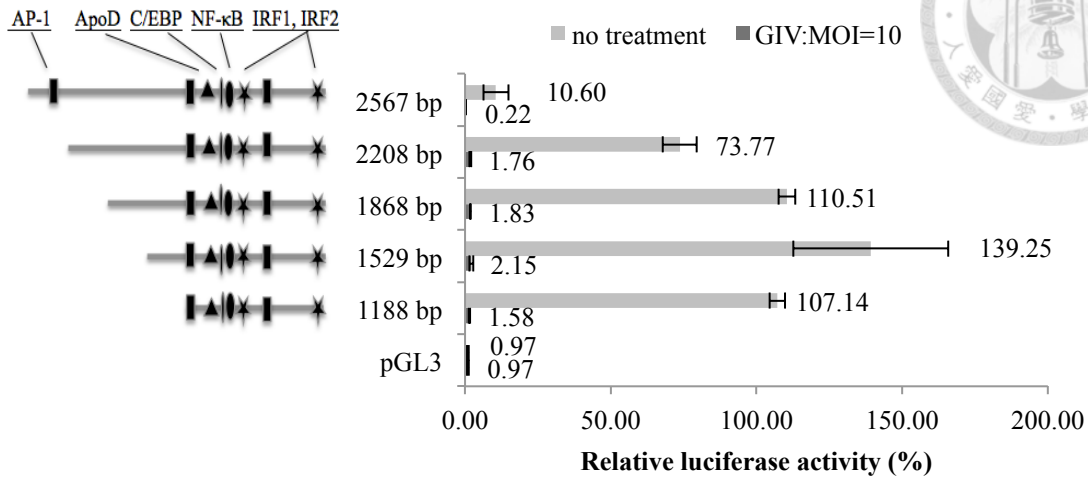
B



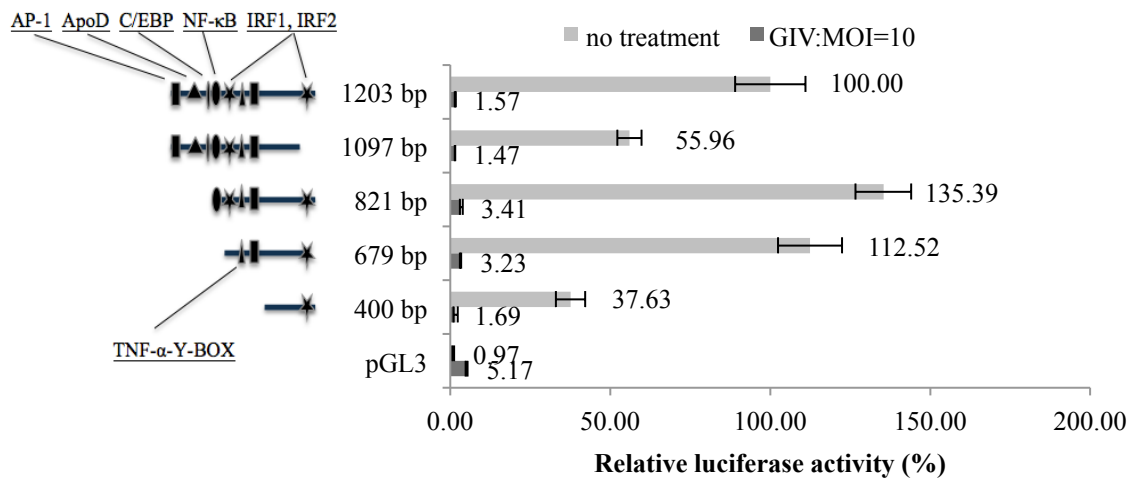
圖五、在 GK 細胞中不同濃度 poly(I:C) 對不同長度 CD9 啟動子活性影響。

各將 0.7 μ g pGL3-CD9-2.6 K、pGL3-CD9-2208 bp、pGL3-CD9-1868 bp、pGL3-CD9-1529 bp、pGL3-CD9-1188 bp、pGL3-CD9-1.2 K、pGL3-CD9-1097 bp、pGL3-CD9-821 bp、pGL3-CD9-679 bp、pGL3-CD9-400 bp、pGL3 及 0.07 μ g 的 pRL-CMV 作為 internal control，轉染於 GK 細胞 18 小時後添加 poly(I:C)，6 小時後，測定 firefly luciferase 與 *Renilla* luciferase 的表現量，兩者讀值相除後，三重覆平均 \pm 標準差，以 1.2 Kb 活性為 100%。不同濃度 Poly(I:C) 的添加，均無顯著差異。

A



B

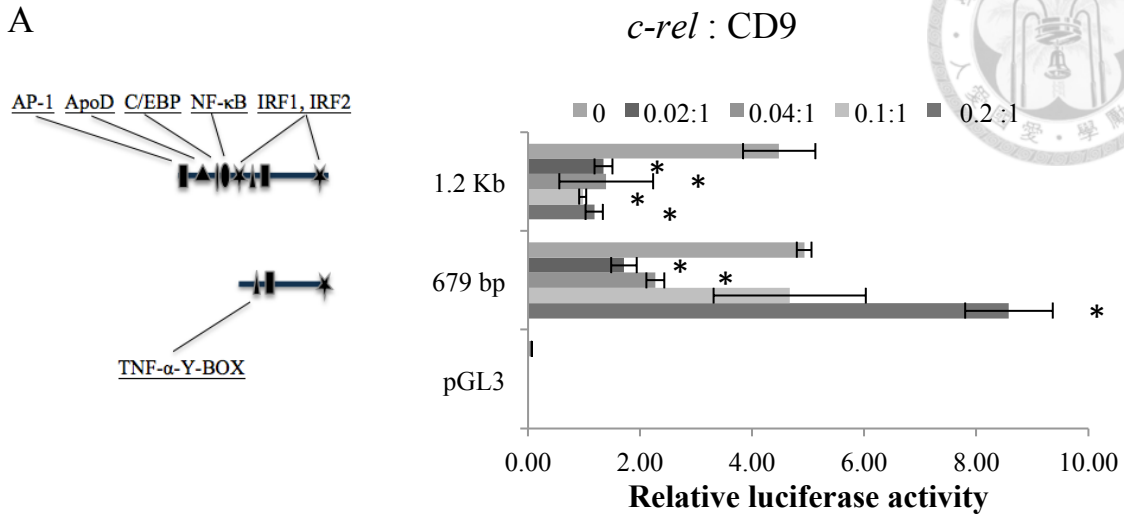


圖六、GIV 的感染 (MOI=10) 對不同長度點帶石斑魚 CD9 啟動子在 GK 細胞中表現影響。

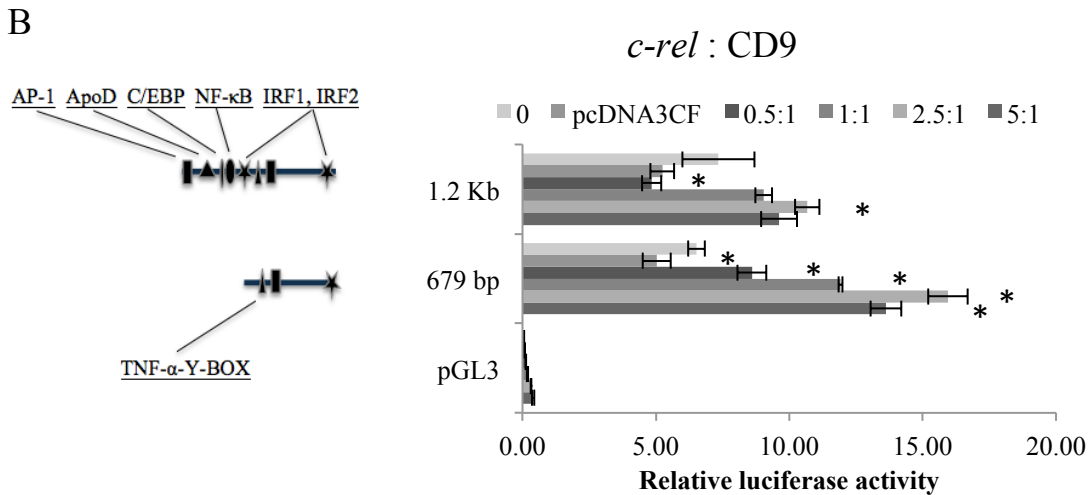
各將 0.7 μ g pGL3-CD9-2.6 K、pGL3-CD9-2208 bp、pGL3-CD9-1868 bp、pGL3-CD9-1529 bp、pGL3-CD9-1188 bp、pGL3-CD9-1.2 K、pGL3-CD9-1097 bp、pGL3-CD9-821 bp、pGL3-CD9-679 bp、pGL3-CD9-400 bp、pGL3 及 0.07 μ g 的 pRL-CMV 作為 internal control，轉染於 GK 細胞 18 小時後，以 GIV (MOI = 10) 感染 9 小時，測定 firefly luciferase 與 *Renilla* luciferase 的表現量，兩者讀值相除後，三重覆平均 \pm 標準差，以 1.2 Kb 活性為 100%。相較於未感染 GIV 的 CD9 啟動子，感染 GIV 後之 CD9 啟動子，近乎不表現。



A



B

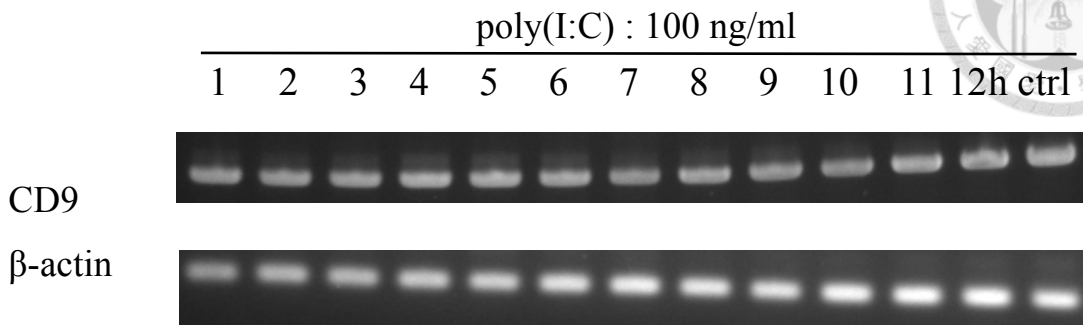


圖七、共同轉染石斑魚 *c-rel* 基因對點帶石斑魚 CD9 啟動子的活化分析。

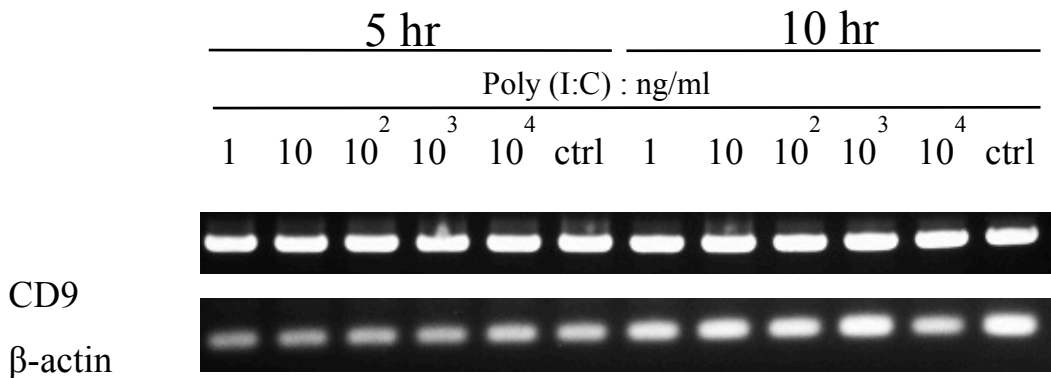
各將 0.7 μ g pGL3-CD9-1.2 K、pGL3-CD9-679 bp、pGL3、pcDNA3CF 及 0.07 μ g 的 pRL-CMV 作為 internal control，與 pcDNA3CF-*c-rel* 共同轉染於 GK 細胞 24 小時後，測定 firefly luciferase 與 *Renilla* luciferase 的表現量，兩者讀值相除後，三重覆平均 \pm 標準差，以 1.2 Kb CD9 啟動子活性為 100%。(A) 共同轉染 CD9 啟動子量(0.7 μ g) 之 0.02 倍 (0.014 μ g)、0.04 倍 (0.028 μ g)、0.1 倍 (0.07 μ g) 及 0.2 倍(0.14 μ g) 的 pcDNA3CF-*c-rel*。(B) 共同轉染 CD9 啟動子量(0.7 μ g) 之 0.5 倍 (0.35 μ g)、1 倍、2.5 倍 (1.75 μ g)、5 倍 (3.5 μ g)。* 表示有顯著差異者(P < 0.05%)。



A



B

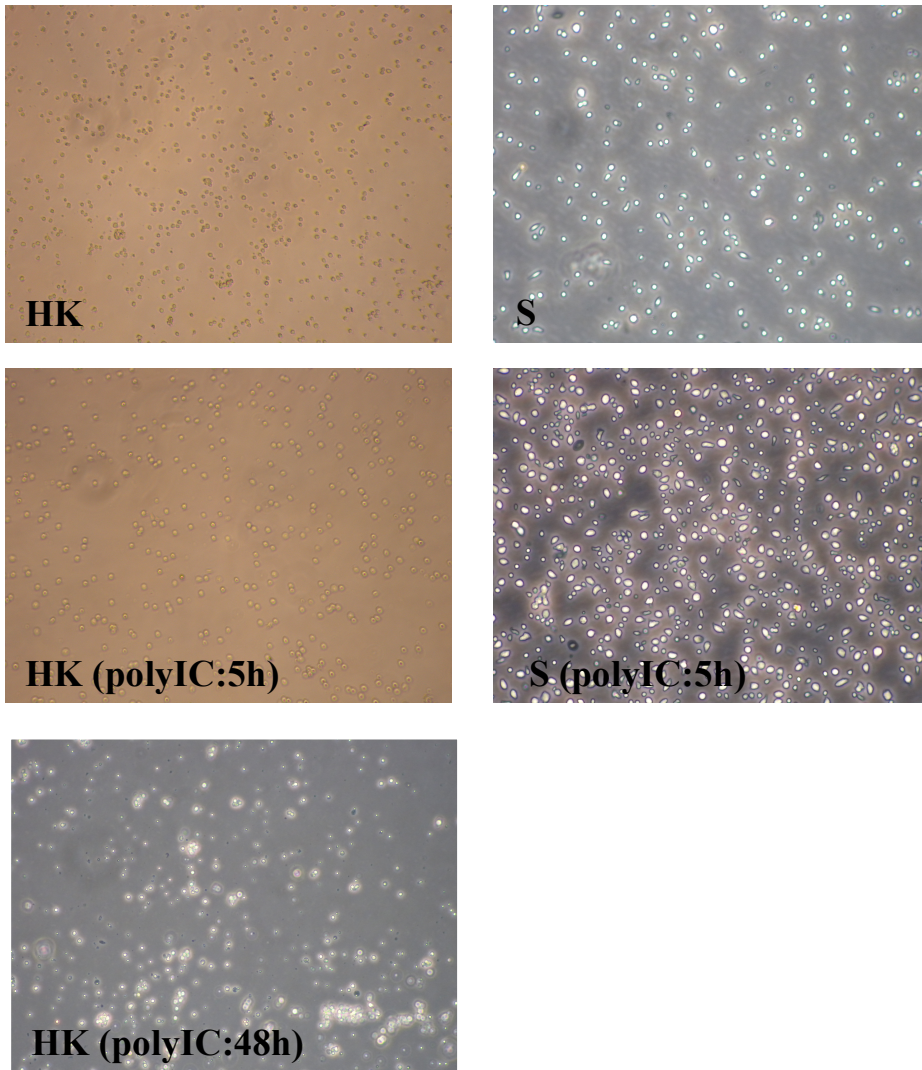


圖八、poly (I:C)處理不同時間點及濃度在 GK 細胞中內 CD9 的表現情形。

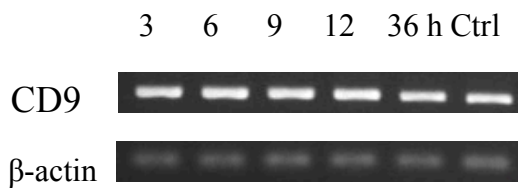
(A) GK 細胞 seeding overnight 後，處理以 100 ng/ml poly(I:C) 後，分別在 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 小時收下其總 RNA，進行 RT-PCR，其中以未添加 poly(I:C) 者作為控制組 ctrl， β -actin 作為 internal control，可發現，CD9 的表現在 100 ng/ml poly(I:C) 的處理下，並不隨時間而有所差異。(B) GK 細胞 seeding overnight 後，分別添加 1、10、100、1,000、10,000 ng/ml poly(I:C)，並各於 5、10 小時收下總 RNA，其中以未添加 poly(I:C) 者作為控制組 ctrl， β -actin 作為 internal control，得知不同時間點及不同 poly(I:C) 濃度均不造成表現量的差異。



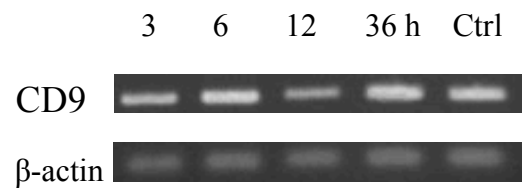
A



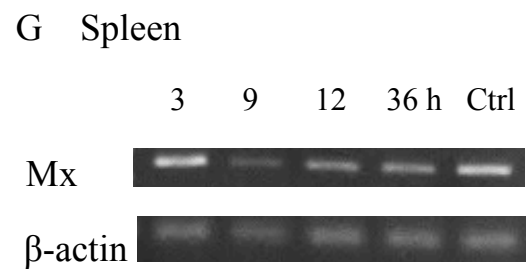
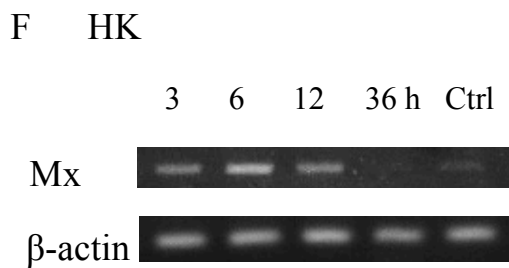
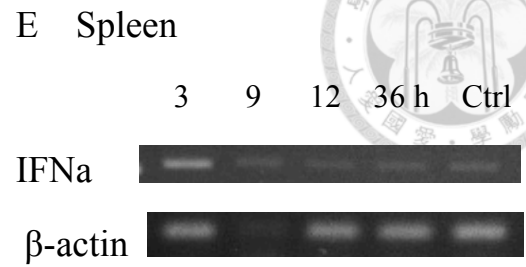
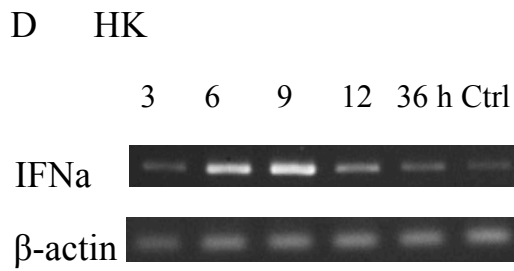
B HK



C Spleen



圖九、Poly (I:C) 對點帶石斑魚 CD9、IFN 和 Mx 基因在 HK 及 Spleen 白血球細胞表現的影響。



圖九、Poly (I:C) 對點帶石斑魚 CD9、IFN 和 Mx 基因在 HK 及 S 白血球細胞表現的影響。

(A) Percoll 純化之 HK 與 Spleen 白血球細胞，培養於 10% FBS L15 培養液，添加 5 μ g/ml，5 小時後，細胞形態正常，48 小時後發現 HK 白血球細胞有部份死亡，並懸浮於液面的現象 (如圖 HK polyIC: 48h)，Spleen 細胞則亦開始死亡並有黑短細條狀物產生 (未顯示於此)。(B)、(C)、(D)、(E)、(F) 及 (G) 將上述純化後之 HK 及 S 白血球細胞各加 poly(I:C) 5 μ g/ml，於 3、6、9、12 及 36 小時收下其總 RNA，合成 cDNA 後，以 CD9、IFN、Mx 及 β -actin 之專一性引子進行 PCR，未添加 poly(I:C) 為控制組 (ctrl)，其中 β -actin 作為 internal control。

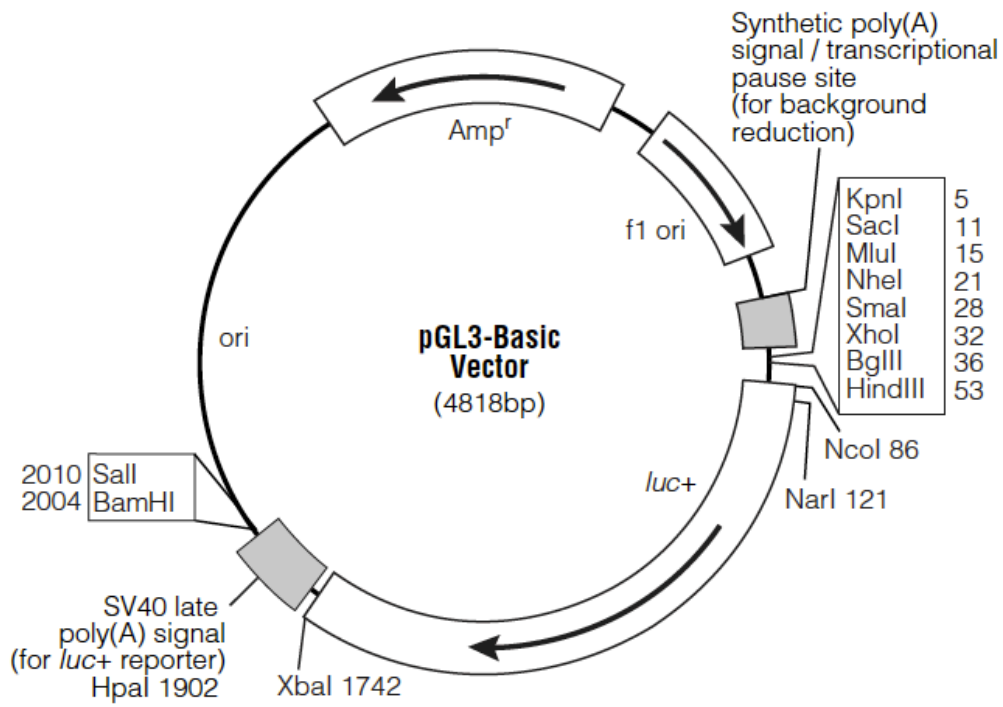
表一、實驗使用之引子序列

目的	代號	引子序列
CD9 染色體步移技術 (genome walking)	CD9-pro-SP2R	5'-TGCAGAAGAGGCCACATCCATCCA-3'
	CD9-pro-SP1	5'-TGCCATAATGATCACCGAGTTG-3'
CD9 啟動子分析 (promoter assay)	CD9-1203-F-Kpn1	5'-GGGGTACCCGTATTACCAGCTGCTCCATC-3'
	CD9-2567-F-KpnI	5'-GGGGTACCCCTGATACACACTGCTGAGGGAG-3'
	CD9-1-R-XhoI	5'-CCGCTCGAGGATCACCGAGTTGTTGTGCTG-3'
CD9 啟動子刪除 (promoter deletion)	CD9-pro1.2F-382	5'-GGGGTACCGACGGATAGCACATCACACTTC-3'
	CD9-pro1.2F-524	5'-GGGGTACCTCCAGTGTGGGCTCCTGTTT-3'
	CD9-pro1.2F-803	5'-GGGGTACCCAATGGAATGACAGAGAGCGG-3'
	CD9-1-R-XhoI	5'-CCGCTCGAGGATCACCGAGTTGTTGTGCTG-3'
	CD9-1203-F-Kpn1	5'-GGGGTACCCGTATTACCAGCTGCTCCATC-3'
	CD9-pro1.2R-1079	5'-CCGCTCGAGCACGCGACATCAAAACATTCAC-3'
	CD9-pro2.6F-359	5'-GGGGTACCCCTCACAATGCTGAACAACACTG-3'
	CD9-pro2.6-F-699	5'-GGGGTACCCAACACCTTGTTCCAACCTTGAAG-3'
	CD9-pro2.6-F-1038	5'-GGGGTACCCAGCAGGATAACGCACCATGTC-3'
	CD9-pro2.6-F-1379	5'-GGGGTACCAAACGTATTACCAGCTGCTC-3'
	CD9-1-R-XhoI	5'-CCGCTCGAGGATCACCGAGTTGTTGTGCTG-3'

表一、實驗使用之引子序列

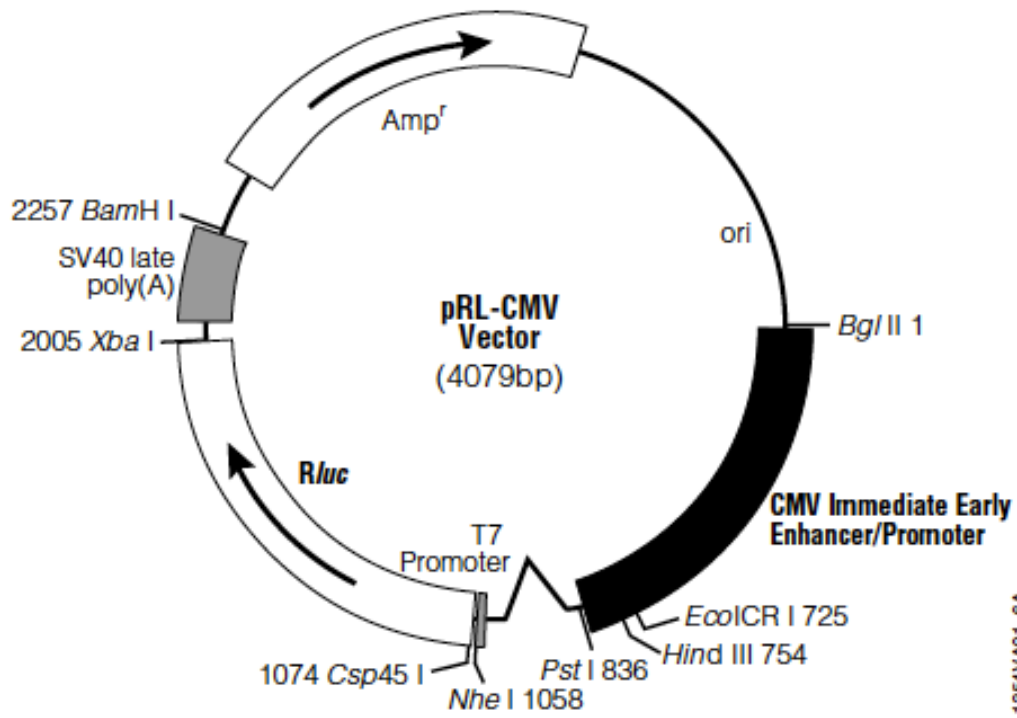
目的	代號	引子序列
CD9 反轉錄聚合酶 鏈式反應 (RT-PCR)	CD9-mRNA-F	5'-ATGGCACTGGATGGATGTGGCC-3'
	CD9-mRNA-R	5'-CACGGCGGAATAGTACGCAGTC-3'
	Osg-β-actin-F	5'-GCCCCACCAGAGCGTAAATA-3'
	Osg-β-actin-R	5'-CATCGTACTCCTGCTTGCTGAT-3'
	IFN-F	5'-GTCCTTCCCGAATCATCTGTACAGCCA G-3'
	IFN-R	5'-GCTTGAGAGTCTCTTGAAGTACATGTG CAGC-3'
	Mx-F	5'-CTGATGGAGAGAGGACTCTG-3'
	Mx-R	5'-CTGATGGCATCCTGAGTGAAAGC-3'

附錄一、實驗所使用之質體—pGL3

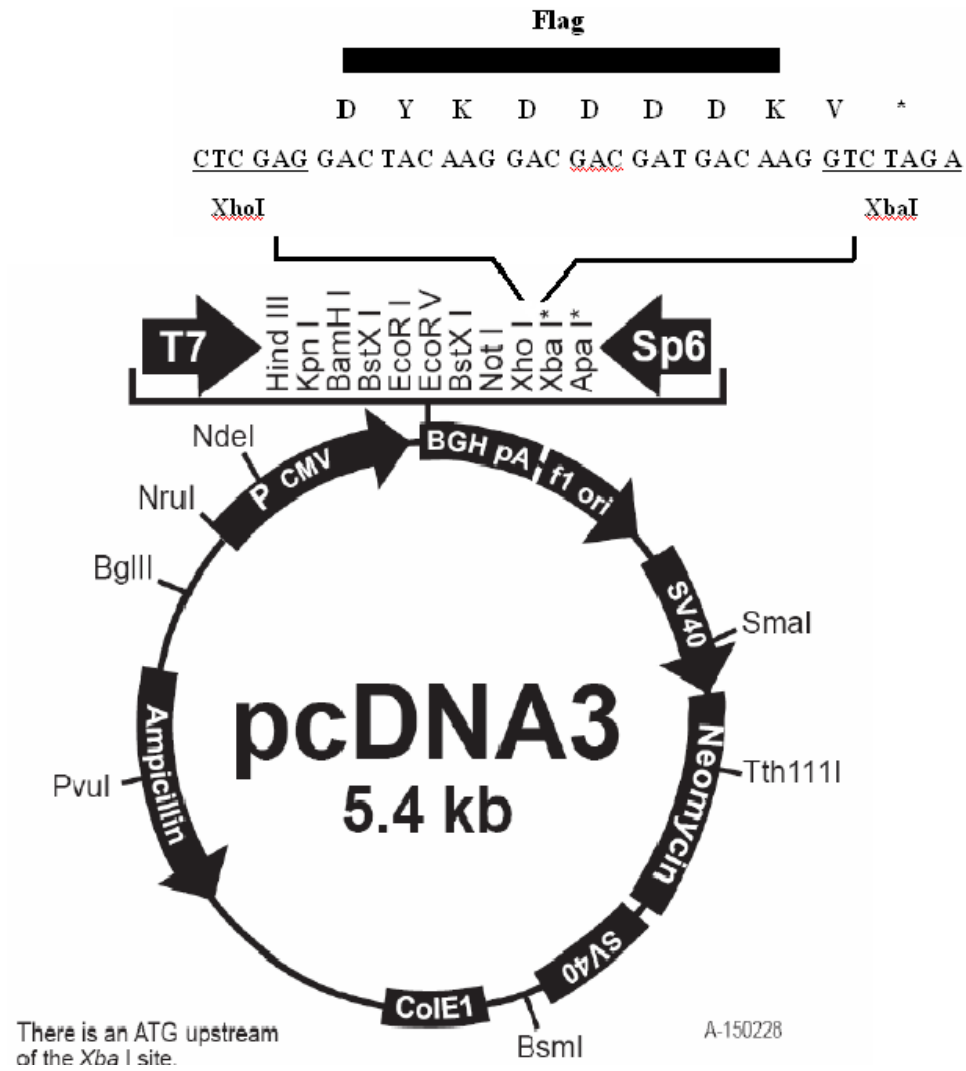


0746VA08_4A

附錄二、實驗所使用之質體—pRL-CMV

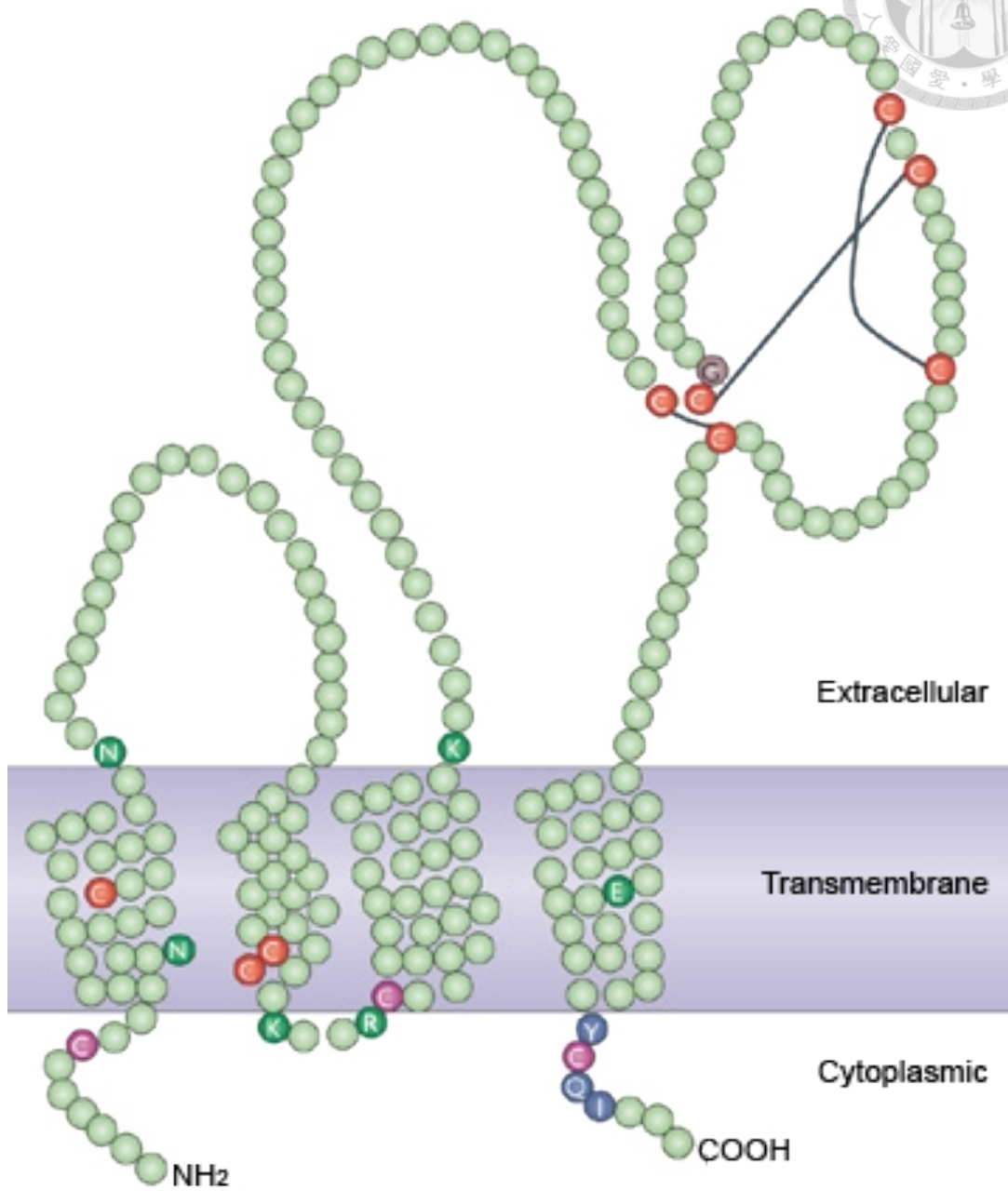
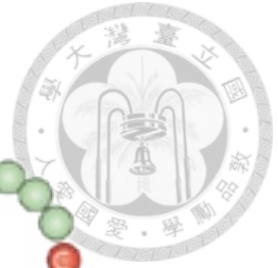


附錄三、實驗所使用之質體—pcDNA3CF



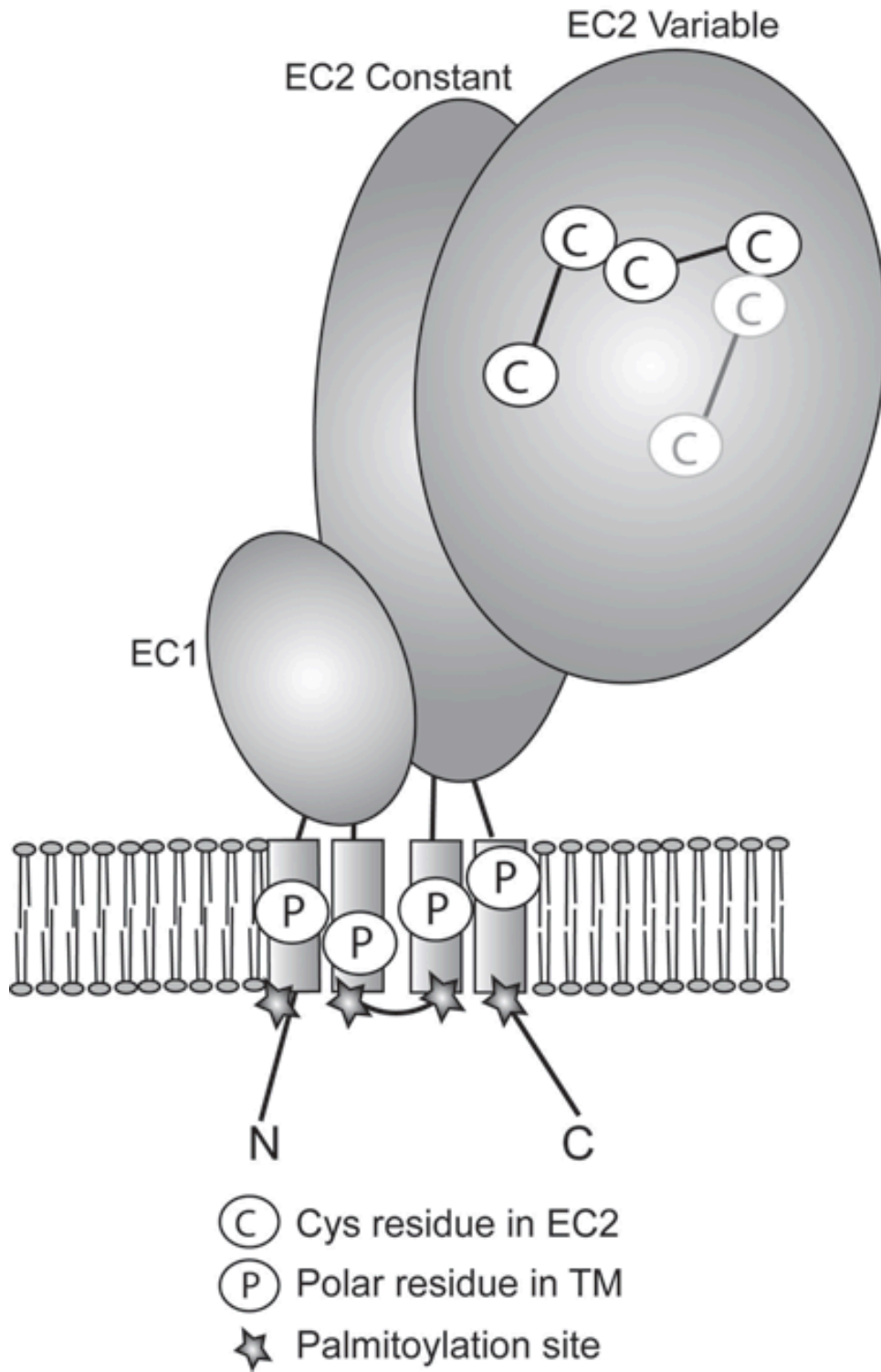
(Yao and Yang, 2003)

附錄四、四穿膜蛋白結構 (一)

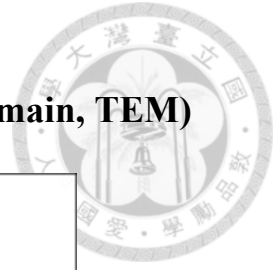


(Zöller, 2009)

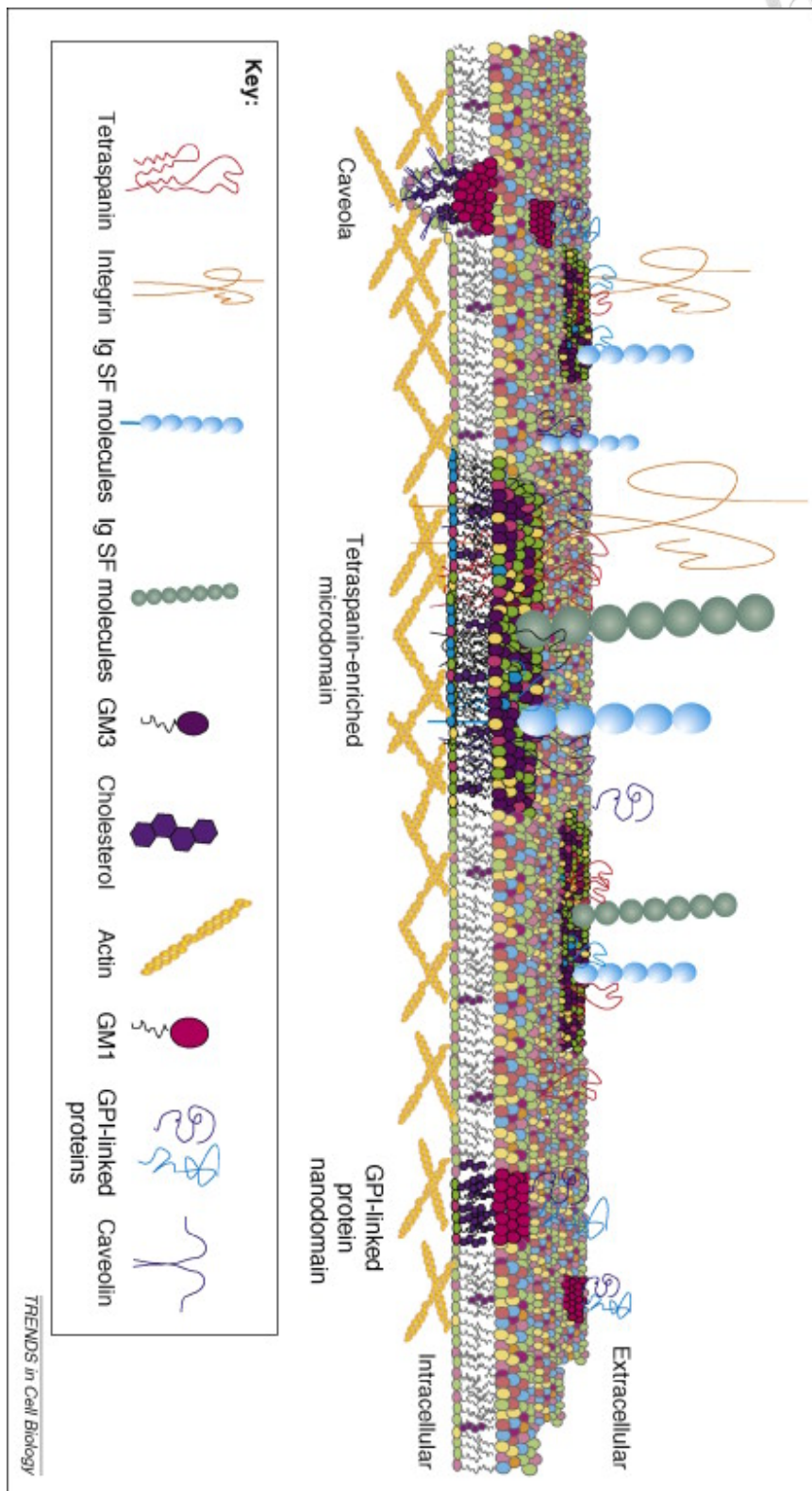
附錄五、四穿膜蛋白結構 (二)



(Monk and Partridge, 2012)



附錄六、四穿膜蛋白網 (tetraspanin-enriched microdomain, TEM)



(Yáñez-Mó et al., 2009)